

Synthese und Screening von Inhibitoren der mikroRNA-Reifung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
im Fach Chemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Dipl.-Chem. Claudine Mercedes Dojahn, geb. Klemm

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Jan-Hendrik Olbertz

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Stefan Hecht, PhD

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Christoph Arenz
2. Prof. Dr. Oliver Seitz

Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2013

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	v
Kurzfassung.....	vii
Abstract.....	ix
Abkürzungsverzeichnis.....	xi
1 Einleitung	1
2 Stand der Forschung.....	3
2-1 miRNA-Biogenese und post-transkriptionale Genregulation durch miRNAs.....	3
2-2 miRNA Funktion und Krankheiten	4
2-3 Inhibition der miRNA-Funktion durch anti-miRs	6
2-3.1 Grundlagen der sequenzspezifische Adressierung von miRNAs	6
2-3.2 Beispiele für anti-miRs.....	8
2-4 Modulation der miRNA-Funktion durch niedermolekulare Verbindungen	11
2-5 prä-miRNAs als Zielmoleküle für niedermolekulare Verbindungen	13
2-6 Peptide und Peptoide als Binder von prä-miRNA	16
2-7 Aminoglykoside als Binder von prä-miRNA	17
2-7.1 Aminoglykoside als Binder von RNA-Sekundärstrukturen.....	17
2-7.2 Grundlagen der RNA-Erkennung durch Aminoglykoside.....	19
2-7.3 Derivatisierung von Aminoglykosiden	21
2-7.4 Dimerisierte Aminoglykoside als Binder von RNA-Sekundärstrukturen.....	22
2-7.5 Multivalente Verknüpfungen von Aminoglykosiden durch CuAAC	23
2-8 Detektion der miRNA-Reifung.....	27
2-9 Chemo-enzymatische, ortsspezifische Modifizierung von RNA	28
2-9.1 Synthese von RNA.....	28
2-9.2 CuAAC als post-synthetische Modifizierungsstrategie von RNA.....	30
3 Zielsetzung	33
4 Ergebnisse und Diskussion	37
4-1 Synthese potentieller Inhibitoren der miRNA-Reifung.....	37
4-1.1 Synthese von 4-O-Alkynyl-2-DOS.....	38
4-1.2 Synthese von Propargyl-modifiziertem Neamin.....	41
4-1.3 Synthese der Bisazide	45
4-1.4 Aufbau der Substanzbibliothek durch CuAAC	48
4-2 Durchführung und Auswertung des Screenings	52
4-2.1 Hintergrundinformationen zur Durchführung des Reifungsassays	52
4-2.2 Aminoglykoside als Inhibitoren der miRNA-Reifung	53
4-2.3 Identifizierung von Inhibitoren der miRNA-Reifung.....	54
4-2.4 Untersuchungen zur selektiven Inhibition der miRNA-Reifung,	57

4-3	Synthesen von Alkin-modifizierten Ribonukleotiden.....	62
4-3.1	Synthese eines Alkin-modifizierten <i>T4 RNA Ligase 1</i> Substrats.....	63
4-3.2	Synthese eines Transkriptionsstarters für die <i>in-vitro</i> -Transkription.....	67
4-4	Chemo-enzymatische Modifizierung von prä-miRNAs	70
4-5	Synthese einer prä-miRNA-Sonde zur Detektion der miRNA-Reifung <i>in cellulo</i>	74
4-6	Chemo-enzymatisches, ortsspezifisches, internes Labeling von RNA	76
5	Zusammenfassung und Ausblick.....	79
5-1	Synthese und Screening von Inhibitoren der miRNA-Reifung.....	79
5-2	Chemo-enzymatische Funktionalisierung von prä-miRNAs	83
6	Experimenteller Teil.....	87
6-1	Chemikalien, Lösungsmittel, Puffer	87
6-2	Messgeräte und Hilfsmittel	87
6-3	Synthesevorschriften zum Aufbau der Substanzbibliothek.....	90
6-3.1	Synthesevorschriften für Alkin-modifizierte 2-Desoxystreptaminderivate	90
6-3.2	Synthesevorschriften für Alkinderivate	95
6-3.3	Synthesevorschriften für Alkin-modifizierte Neaminderivate	96
6-3.4	Synthesevorschriften für die Bisazide	100
6-3.5	Aufbau der Substanzbibliothek durch CuAAC	110
6-4	Synthesevorschriften für ein Alkin-modifiziertes <i>T4 RNA Ligase 1</i> Substrat.....	129
6-5	Synthesevorschriften für einen Alkin-modifizierten <i>in-vitro</i> -Transkriptionsstarter ..	138
6-6	Molekularbiologischer Teil	143
6-6.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	143
6-6.2	Lösungen und Puffer.....	143
6-6.3	Enzyme, Kits, DNA- und RNA-Längenstandards, Oligonukleotide und Nukleotide...	144
6-6.4	DNA-Template, RNA-Oligomere und Primer.....	144
6-6.5	Molekularbiologische Messgeräte und Hilfsmittel	146
6-6.6	Molekularbiologische Methoden.....	147
6-6.7	Durchführung der Reifungsassays.....	154
7	Anhang.....	157
	Literatur.....	185
	Eidesstattliche Erklärung.....	197
	Danksagung.....	199

Kurzfassung

Die Entdeckung der mikroRNAs (miRNAs) hat zusammen mit dem Phänomen der RNA-Interferenz das Verständnis der Genregulation grundlegend verändert. Bis heute wurden mehr als 2000 humane miRNAs identifiziert, die auf post-transkriptionaler Ebene die Genexpression regulieren und dadurch zellphysiologische Prozesse steuern. Sie reifen in mehreren enzymatischen Schritten, ausgehend von den primären Transkripten (pri-miRNAs) über die Stufe der Präkursor-miRNAs (prä-miRNAs) zu vollständig aktiven miRNAs heran. Die Annahme eines kausalen Zusammenhangs zwischen aberranten miRNA-Expressionsmustern und Krankheiten wird gegenwärtig durch eine Vielzahl an Experimenten gestützt und macht miRNAs zu interessanten Zielmolekülen der aktuellen Wirkstoffforschung. Wird eine Krankheit durch einen erhöhten miRNA-Spiegel verursacht, ist die Inhibierung des finalen Reifungsschrittes ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese niedermolekularer Verbindungen, die an die prä-miRNA binden und dadurch die Reifung zur miRNA inhibieren. Jene prä-miRNAs sind nur partiell selbst-komplementär und bilden in Abhängigkeit ihrer Basensequenz ein charakteristisches Muster aus Schleifen und Ausbuchtungen. Diese RNA-Sekundärstrukturen stehen prinzipiell für eine Bindung kleiner Moleküle zur Verfügung. Die dreidimensionale Struktur von prä-miRNAs ist allerdings sehr dynamisch und mit den heutigen Methoden nur ungenau vorhersagbar. Daher erschien der modulare Aufbau einer strukturell diversen Substanzbibliothek potentieller prä-miRNA-Binder zweckmäßig. Dazu sollten die prädestinierten RNA-Binder 2-Desoxystreptamin sowie Neamin mit Alkinen funktionalisiert und durch Kupfer-katalysierte Azid-Alkin 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC) mit verschiedenen bivalenten Aziden verknüpft werden. Die Dimerisierung zielte darauf ab, Affinität und Selektivität bei einer potentiellen Bindung der Zielprä-miRNA zu erhöhen.

vii

Im Rahmen dieses Projekts wurde der synthetische Zugang zu den benötigten Alkin- sowie Azid-funktionalisierten Grundbausteinen optimiert. Ferner wurde ein effektives und zuverlässiges Protokoll für die Kupfer-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition erarbeitet, welches es ermöglichte, 88 Testsubstanzen in guter Ausbeute und hoher Reinheit zu isolieren. Anschließend wurde erstmalig eine Substanzbibliothek dieser Größe in einem BRCA-Reifungsassay auf die Inhibition der miRNA-Reifung getestet. Dieser Assay wurde unter kompetitiven Bedingungen mit den prä-miRNA-Paaren prä-let7/-Bantam sowie prä-miR-21/-122 durchgeführt. Dabei wurden mehrere potente Inhibitoren der miRNA-Reifung mit IC_{50} -Werten von bis zu 0.5 μ M für die Neamin- und bis zu 1 μ M für die 2-Desoxystreptamindimere identifiziert. Darüber hinaus ermöglichte das Screening zum ersten Mal einen tieferen Einblick in die strukturellen Zusammenhänge zwischen Aminoglykosid-Derivaten und einer Inhibition der miRNA-

Reifung. Insbesondere Dimere, die über einen aromatischen Linker wie z. B. Anthracen oder Fluoren verknüpft waren, zeigten ein hohes inhibitorisches Potential. Zudem wurde einerseits die Schlussfolgerung gezogen, dass eine Dimerisierung von Aminoglykosiden die Inhibition der miRNA-Reifung verstärken kann. Andererseits ist die bivalente Präsentation von Aminoglykosiden scheinbar nicht ausreichend, um das charakteristische Muster der prä-miRNA-Sekundärstrukturen selektiv zu adressieren, denn die ermittelten IC₅₀-Werte unterschieden sich unabhängig vom prä-miRNA-Paar maximal um den Faktor drei. Dahingehen können die aus dem Screening gewonnenen Erkenntnisse nützlich sein, um die Struktur von multivalenten prä-miRNA-Bindern auf Aminoglykosid-Basis so zu optimieren, dass die miRNA-Reifung selektiv inhibiert wird.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Etablierung einer chemo-enzymatische RNA-Funktionalisierungsstrategie, die dazu genutzt werden sollte, prä-miRNA-Sonden herzustellen, die sich für die Detektion der miRNA-Reifung *in cellulo* eignen. *In-vitro*-Transkriptionen mit der T7-RNA-Polymerase sowie Ligationen mit der T4 RNA Ligase 1 sollten das Fundament der enzymatischen RNA-Synthese sein, während die Funktionalisierung der RNA durch CuAAC erzielt werden sollte. Daher musste ein synthetischer Zugang zu Alkin-modifizierten Ribonukleotiden erarbeitet werden.

In diesem Zusammenhang wird in dieser Arbeit zum ersten Mal die Synthese von 3',5'-O,O-Bisphosphat-5-ethynyluridin sowie O-(5'-Guanosin)-O-propargylmonophosphat beschrieben. Das Guanosinderivat konnte als Transkriptionsstarter durch *in-vitro*-Transkription an das 5'-Ende von prä-miRNAs eingeführt und anschließend durch CuAAC mit einem Fluoreszenzlöcher modifiziert werden. Das Uridinbisphosphat wurde durch CuAAC mit einem Fluorophor markiert und anschließend effizient mit der T4 RNA Ligase 1 an das 3'-Ende verschiedener prä-miRNAs ligiert. Insgesamt wurden mit diesem Verfahren fünf fluoreszenzbasierte prä-miRNA-Sonden hergestellt, die sich für die Detektion der miRNA-Reifung *in cellulo* eignen. Darüber hinaus war es auch möglich, statt des Fluorophor-derivatisierten Uridinbisphosphats, dessen Alkin-modifizierte Vorstufe an das 3'-Ende von prä-miRNAs zu ligieren. Durch eine zweite Ligation mit einem Oligonukleotid rückte dieses Uridin an eine interne Position und konnte im Anschluss daran durch CuAAC derivatisiert werden. Diese Kombination chemo-enzymatischer Methoden kann in Zukunft eine vielversprechende Strategie darstellen, enzymatisch synthetisierte RNA intern und ortsspezifisch zu markieren.

Abstract

Due to the causal connection between aberrant miRNA expression patterns and disease, miRNAs are intensely discussed as drug targets. In cases where a disease is caused by an enhanced miRNA level, the inhibition of its final maturation step might be worthwhile. Therefore, the objective of this work was the synthesis of small molecules, which bind to pre-miRNAs to prevent their maturation to fully active miRNAs. To create a substance library of bivalent inhibitors, the RNA binding motifs 2-deoxystreptamine as well as neamine were alkyne modified and linked with several bisazides via a copper catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC). Hence, optimized syntheses of the basic building blocks along with an effective and reliable CuAAC-protocol were established. 88 test substances were isolated in good yield and high purity. Finally they were analyzed with regard to their potential to selectively inhibit the miRNA maturation. For this purpose, the assay was performed under competitive conditions with a set of two pre-miRNA-pairs. The initial screening revealed several inhibitors with IC_{50} -values in the lower μM range, especially dimers with anthracene-, fluorene- or *p*-terphenyl-linkers were inhibitory highly active. Moreover, the results of the screening suggest that bivalent RNA-binders have higher binding affinities than their monomer counterparts, but are not effective to allow discrimination between different pre-miRNAs.

The second focus of this work was on the development of a synthetic access to alkyne modified ribonucleotides to establish a chemo-enzymatic functionalization strategy for RNAs using in-vitro-transcription, ligation and CuAAC. In this context, the syntheses of 3',5'-*O,O*-bisphosphate-5-ethynyl uridine and *O*-(5'-guanosine)-*O*-propargyl monophosphate are described for the first time. The guanosine monophosphate was used as transcription starter to address the 5'-end of RNA and was consecutively labeled with an azido-tagged quencher. The uridine bisphosphate was conjugated with a fluorophor and introduced to the 3'-end of RNAs by *T4 RNA ligase 1*. In total, five fluorescence-based pre-miRNA probes have been synthesized by this procedure and are now ready for transfection of cells. Moreover, the uridine bisphosphate can be ligated to the 3'-end without a fluorophor attached, to serve as a connecting point for a further ligation with an oligonucleotide of any length. Thereby, the former terminal alkynylated uridine was shifted to a defined internal position by successive enzymatic reactions and was successfully derivatized with a fluorophor by CuAAC.

Keywords | pre-miRNA, inhibition, RNA recognition, aminoglycosides, 2-deoxystreptamine, neamine, CuAAC, RNA functionalization

Abkürzungsverzeichnis

DNA- und RNA-Nukleotide sowie Aminosäuren wurden durch den Einbuchstabencode abgekürzt. Eine Phosphorylierung am 5'- bzw. 3'-OH wurde durch Notation eines „p“ vor bzw. nach dem Buchstaben angezeigt.

λ	Wellenlänge [nm]	2-DOS	2-Desoxystreptamin
λ_{em}	Emissionswellenlänge [nm]	ds	doppelsträngig
λ_{ex}	Anregungswellenlänge [nm]	DTT	1,4-Dithiothreitol
Abb.	Abbildung		
Ac	Acetyl	EA	Elementaranalyse
ALX	Fluorophor Alexa Fluor® 633	EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzen- tration
APS	Ammoniumpersulfat		
äq	äquatorial	EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopro- pyl)carbodiimid
Äq.	Äquivalente		
Ar	Aryl	EDT	1,2-Ethandithiol
AU	<i>arbitrary units</i>	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ax	axial	EI	Elektronenstoßionisation
		ESI	Elektrosprayionisation
ber.	berechnet	<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl	EtOAc	Essigsäureethylester
br	verbreitertes Singulett (NMR)	exp.	experimentell
BRCA	<i>Branched Rolling Circle Amplification</i>		
BSA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)acetamid	FAM	5,6-Carboxyfluorescein
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis-(trimethylsilyl)trifluoro- acetamid	FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
		FLB	Formamid-Ladepuffer
CE	2-Cyanoethyl	g	Erdbeschleunigung
CuAAC	Kupfer-katalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition	gef.	gefunden
		ges.	gesättigt
C _q	quaternäres Kohlenstoffatom		
		h	Stunde(n)
δ	chemische Verschiebung [ppm]	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazi- nyl)ethansulfonsäure
d	Dublett (NMR)		
d	Tag(e)	HFIP	1,1,1,3,3,3-Hexafluoroisopropanol
DAB	4,4-Dimethylaminoazobenzen-4'- carbonsäure	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
		HPLC	<i>High-performance liquid chroma- tography</i>
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en		
DC	Dünnschichtchromatografie	HRMS	<i>High-resolution mass spectrometry</i>
denat.	denaturiert		
DIPEA	Diisopropylethylamin	IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Kon- zentration
DMAP	Dimethylaminopyridin		
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid		
DMSO	Dimethylsulfoxid	<i>J</i>	Kopplungskonstante [Hz]
DNA	Desoxyribonukleinsäure		
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat	K _D	Dissoziationskonstante
		konz.	konzentriert

LM	Lösungsmittel	t	Triplett (NMR)
LNA	<i>Locked nucleic acid</i>	TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
M	Molarität	TBAI	Tetrabutylammoniumiodid
m	Multiplett (NMR)	TBDMS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
m/z	Verhältnis Masse/Ladung	TBE	Tris/Borat/EDTA
MALDI/TOF	<i>Matrix-assisted laser desorption and ionisation/time-of-flight-mass spectrometry</i>	TBTA	Tris[(1-benzyl-1 <i>H</i> -1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin
Mes	Mesylat	TEAA	Triethylammoniumacetat
min	Minuten	TEAB	Triethylammoniumbicarbonat
miRNA	mikroRNA	TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylen-diamin
mRNA	<i>messenger</i> -RNA	Tf ₂ O	Trifluormethansulfonsäureanhydrid
N	Normalität	TFA	Trifluoressigsäure
n. b.	nicht bestimmt	THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine
NaAsc	Natriumascorbat	Tos	Tosylat
nat.	nativ	<i>t_R</i>	Retentionszeit
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
nt	Nukleotid(e)		
OMe	2'- <i>O</i> -Methyl-Modifikation	UPLC	<i>Ultra-performance liquid chromatography</i>
PA	Polyacrylamid	UTR	untranslatierte Region
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	UV	Ultraviolett
PCI	Phenol/Isoamylalkohol/Chloroform	vgl.	vergleiche
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Vis	<i>visible</i>
PNA	<i>Peptide nucleic acid</i>		
ppm	<i>parts per million</i>		
PS	Phosphorthioat		
q	Quadruplett (NMR)		
<i>R_f</i>	<i>Retardation factor</i>		
RNA	Ribonukleinsäure		
RNAi	RNA-Interferenz		
rNTPs	Ribonukleosidtriphosphat		
RP	<i>Reversed Phase</i>		
RT	Raumtemperatur		
s	Singulett (NMR)		
s.	siehe		
sek	Sekunden		
siRNA	<i>short-interfering</i> RNA		
SLB	Sucrose-Ladepuffer		
ss	einzelsträngig		

1 | Einleitung

„Wir sind fertig“

Pünktlich zum 50. Jubiläum der Doppelhelix-Entdeckung haben öffentlich geförderte Forscher die Entzifferung des menschlichen Genoms abgeschlossen. Die Endversion der Erbgutkarte weist kaum noch weiße Flecken auf.

Spiegel-Online, 10.04.2003

1

So und ähnlich titelten Journale und Tageszeitungen in ihren Wissenschaftsrubriken und bezogen sich dabei auf die neu veröffentlichten Daten des Humangenomprojekts. Diese Leistung markierte aber erst den Anfang der modernen Genomforschung, denn die Entschlüsselung des menschlichen Genoms hatte viel mehr Fragen aufgeworfen als sie beantworten konnte. Intuitiv waren die Forscher davon ausgegangen, dass die Komplexität eines Organismus sich in der Anzahl der Gene widerspiegelt.^[1] Wie konnte es also sein, dass die Anzahl humaner Gene nahezu identisch ist mit der des Fadenwurms *C. elegans*? Und wenn tatsächlich nur ein kleiner Teil des Genoms protein-kodierende Bereiche enthält – was ist dann die biologische Funktion der restlichen DNA-Sequenzen? Wie kann mit so einer kleinen Genmasse aus einer einzelnen befruchteten Eizelle ein komplexer Embryo mit bis zu 200 verschiedenen Zellarten entstehen?

Der Schlüssel zu den Antworten auf diese Fragen liegt nicht in der Anzahl der Gene, sondern in ihrer Regulation. Denn jede Zelle besitzt zwar die gleiche genetische Information, aber nur ausgewählte Gene werden zu einem bestimmten Zeitpunkt oder unter bestimmten Bedingungen aktiviert, in *messenger*-RNA (mRNA) transkribiert und anschließend ins Protein translatiert. Es war lange bekannt, dass chemische Modifizierungen wie Methylierungen von DNA-Basen oder Acetylierung der Histone die Kompaktheit der Chromatinstruktur und somit die Ablesehäufigkeit der DNA beeinflussen. Ob ein Gen

an- oder ausgeschaltet wird, bestimmen Transkriptionsfaktoren, die an Promotorsequenzen vor dem Gen binden und die Transkription einleiten oder unterdrücken können. Darüber hinaus liefert auch das alternative Spleißen von mRNA-Vorläufern einen wichtigen Beitrag für die Vielfalt des Proteoms. Aber erst die Entdeckung der mikroRNAs (miRNAs) hat diesem Netzwerk an Mechanismen zur Genregulation die bis dahin fehlende Dimension für die nötige Komplexität verliehen. Bei miRNAs handelt es sich um kurze RNAs, deren genetische Information in den nicht-kodierenden Bereichen der DNA lokalisiert ist. Nach ihrer Transkription hybridisieren sie mit komplementären Sequenzen einer spezifischen Ziel-mRNA und verhindern so dessen Translation in das Protein. Anders als Transkriptionsfaktoren agieren miRNAs aber nicht als An- und Aus-schalter von Genen, sondern sind feinregulatorisch wirksam.

Die erste miRNA wurde bereits 1993 von Lee *et al.* in *C. elegans* beschrieben, wo sie den Wechsel eines Larvenstadiums induziert.^[2] Aber erst als sieben Jahre später auch let7 als hochkonservierte miRNA-Sequenz in mehreren Spezies identifiziert wurde, setzte sich allmählich die Erkenntnis durch, dass es sich bei dieser Art der Genregulation nicht um einen Sonderfall im Fadenwurm, sondern um einen grundlegenden Mechanismus handelt.^[3] Die dadurch ausgelöste systematische Suche nach weiteren Vertretern hat bis heute über 25000 miRNAs in mehr als 190 Arten zu Tage gefördert und unser Verständnis der Genregulation fundamental verändert.^[4]

2 | Stand der Forschung

2-1 | miRNA-Biogenese und post-transkriptionale Genregulation durch miRNAs

miRNAs sind 21 bis 23 Nukleotide (nt) kurze, nicht-kodierende RNAs endogenen Ursprungs, deren Gene vorwiegend in intergenischen oder intronischen Bereichen des Genoms lokalisiert sind. Aus diesen generiert die RNA-Polymerase II (Pol II) ein bis zu 1000 nt-langes Primärtranskript (pri-miRNA), das typischerweise ein 5'-Cap sowie einen 3'-poly(A)-Rest besitzt und meist polycistronisch ist (Abb. 2-1).^[5] Der Ribonuklease-III-*Drosha*-Mikroprozessor spaltet daraus ca. 60 - 70 nt-lange, haarnadelförmige Präkursor-miRNAs (prä-miRNAs) ab,^[6] die durch *Ran*-GTP-abhängiges *Exportin 5* in das Cytosol exportiert werden.^[7] In einer komplexen Choreografie an- und abdissozierender Proteine, darunter das *TAR RNA-Binding Protein* (TRBP) sowie die Ribonuklease III (RNase III) *Dicer*, wird eine prä-miRNA vom *RISC-Loading Complex* (RLC) erkannt, inkorporiert und von *Dicer* durch Spaltung der terminalen Haarnadelschleife zur reifen miRNA prozessiert.^[8] Dies erfolgt ca. zwei helikale Umdrehungen vom Stammende entfernt, ist sequenzunabhängig und ergibt eine doppelsträngige miRNA, deren Enden das RNase-III-typische Schnittmuster aus 5'-Phosphat und 3'-2-nt-Überhang aufweisen.^[9] Der *RISC-Loading Complex* definiert die beiden Stränge durch Vergleich der thermodynamischen Stabilität beider Duplexenden.^[10] Meist wird der Strang zur agierenden miRNA (*guide strand*), dessen 5'-Ende im Duplex zuvor weniger stark hybridisiert war.^[11] Neueste Befunde deuten aber an, dass auch der entwundene, gegenüberliegende Strang (*passenger strand*) eine funktionale Rolle inne haben kann und nicht immer, wie ursprünglich angenommen, abgebaut wird.^[12]

Die Rekrutierung eines der vier Proteine aus der *Argonaute*-Familie (*Ago*) führt schließlich zum *miRNA-induced silencing complex* (miRISC). Die darin enthaltene einzelsträngige miRNA dirigiert den Komplex nach dem Prinzip der Sequenzkomplementarität zur 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der Ziel-mRNA und bindet diese über eine Hepta-

mersequenz am 5'-Ende der miRNA (sog. *seed*-Region, ~ nt 2-8).^[13] Unter Voraussetzung einer vollständigen Komplementarität über alle weiteren Basenpaare, wird die mRNA gespalten, freigesetzt und anschließend abgebaut. Die miRNA bleibt dabei intakt und steht somit für die Genstilllegung von weiteren Ziel-mRNAs zur Verfügung. In Säugetierzellen sind die miRNA-mRNA-Duplexe jedoch meist unvollständig komplementär (Abb. 2-1, unten). Für diese Fälle ist der genaue Wirkmechanismus zur Repression der Translation nach wie vor Gegenstand aktueller Forschung. Diskutiert wird, ob der miRISC die Initiation der Translation erschwert, z. B. durch Blockade essentieller Synergien zwischen 5'-Cap und 3'-poly(A)-Rest oder ob er ein Abdissoziieren der Ribosomen verursacht und so die Elongation der Translation unterdrückt.^[14] Die Ergebnisse aktueller Studien rücken jedoch ein drittes Szenario in den Fokus, demzufolge die mRNAs durch Deadenylierung destabilisiert und nachfolgend in sog. *Processing Bodies* zwischengelagert oder vollständig abgebaut werden.^[15]

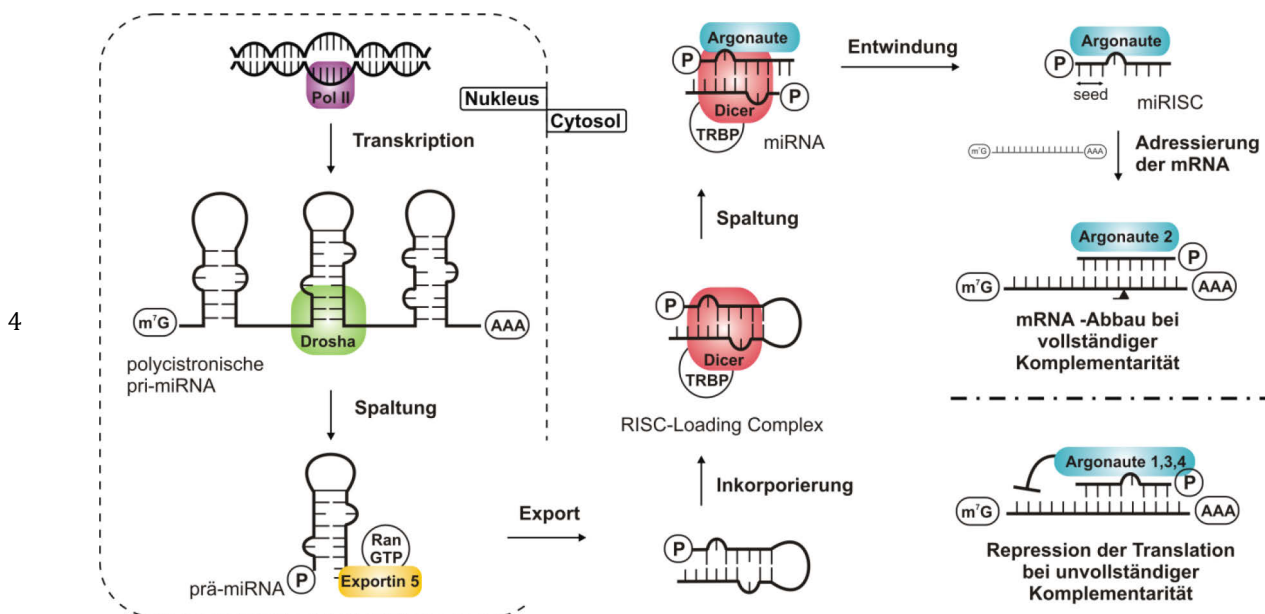


Abb. 2-1 | Modell der miRNA-Biogenese und post-transkriptionalen Genregulation | miRNAs sind endogenen Ursprungs und werden ausgehend von meist polycistronischen Primärtranskripten durch die RNase-III-Enzyme *Drosha* und *Dicer* zur reifen miRNA prozessiert. Die Entwindung des *passenger strands* sowie die Rekrutierung des miRISC führen zur Hybridisierung der korrespondierenden mRNA, die je nach Grad der Komplementarität abgebaut oder durch einen noch unbekannten Mechanismus an der Translation gehindert wird.

2-2 | miRNA-Funktionen und Krankheiten

Ermöglicht durch *Deep-Sequencing*-Experimente, ist die Anzahl der identifizierten humanen, reifen miRNAs in den letzten Jahren stark gewachsen und liegt aktuell bei 2042.^[16] Um die Funktion einzelner miRNAs zu studieren, wird zusätzlich die Sequenz der von ihnen regulierten Ziel-mRNAs benötigt. Da die *seed*-Region der miRNAs jedoch sehr kurz ist und die post-transkriptionale Genregulation nicht auf vollständiger Komplementarität basiert, ist eine einzelne miRNA in der Lage bis zu 200 mRNAs zu regulieren, deren Funktionen völlig unterschiedlich sein können.^[17] Umgekehrt wird eine

mRNA auch von verschiedenen miRNAs adressiert. Darüber hinaus wurde berichtet, dass miRNAs nicht ausschließlich in der 3'-UTR, sondern auch in dem protein-kodierenden Bereich oder der 5'-UTR einer mRNA binden.^[18] Diese Vielfalt bei der Adressierung von mRNAs ist einerseits eine wichtige Voraussetzung, damit miRNAs als Feinregulatoren der Genexpression agieren können, andererseits erschwert sie aber auch das Auffinden der Ziel-mRNAs und die Identifizierung ihrer genauen Funktion. Aus den bisherigen Erkenntnissen wird geschlussfolgert, dass miRNAs im Wesentlichen zellphysiologische Prozesse wie Zellwachstum, Proliferation, Differentiation und Apoptose steuern.^[19] Eine Störung eben dieser Prozesse korreliert mit der Pathogenese von Krebs und wurde schon früh in einen kausalen Zusammenhang mit aberranten miRNA-Expressionsmustern gestellt. Diese Hypothese wird gegenwärtig durch eine Vielzahl von Beobachtungen untermauert.

Einen ersten Hinweis lieferte die Veröffentlichung von Calin *et al.*, die zeigte, dass in Blutproben von Patienten mit chronisch lymphatischer Leukämie vom B-Zell-Typ (B-CLL) miR-15a und miR-16-1 herunterreguliert sind, und dass die mir-15a-/16-1-Gene geclustert auf dem 13q14-Lokus liegen. Diese Region fehlt in 60 % aller B-CLL-Fälle.^[20] Eine daran anknüpfende funktionale Studie identifizierte den anti-apoptotischen Faktor *BCL2* als Ziel-Protein von miR-15a und miR-16-1, welches in malignen B-Zellen typischerweise stark überexprimiert ist. Wurde der miR-15a- sowie der miR-16-1-Spiegel erhöht, führte dies sowohl zu einer verringerten *BCL2*-Translation als auch einer verstärkten Apoptoseinduktion.^[21] Angeregt durch diese Ergebnisse gliederte die Forschergruppe die Lage von 186 miRNA-Genen mit denen bekannter genetischer Veränderungen ab und stellte fest, dass 50 % dieser Gene in der Nähe fragiler oder Krebs-assoziiierter Regionen des Genoms lokalisiert sind.^[22] Bis heute wurde in nahezu allen Krebstypen eine kausalverknüpfte abnormale Expression spezifischer miRNAs dokumentiert.^[23] Darüber hinaus weist der Vergleich von Expressionsprofilen aus Gewebeproben gesunder oder an Krebs erkrankter Patienten nach, dass der miRNA-Spiegel in Tumorzellen global runterreguliert ist.^[24] Umgekehrt führt auch die globale Repression der miRNA-Reifung durch mutierte *Dicer*- oder *Drosha*-Varianten zu einer beschleunigten Tumorbildung.^[25]

5

Um die Vielzahl an Publikationen auf diesem Gebiet besser zu strukturieren, werden oncomirs – miRNAs, deren Fehlexpression mit Krebserkrankungen in Verbindung gebracht wird – in tumor-suppressive bzw. onkogene miRNAs eingeteilt.^[26] miR-21 ist eine prominente Vertreterin onkogener miRNAs, welche in einer Vielzahl humaner Krebszelllinien wie Brust-, Lungen-, Magen-, Bauchspeicheldrüsen- oder Darmkrebs überexprimiert ist.^[27] Diese Tatsache deutet auf eine Schlüsselrolle in der Karzinogenese sowie Metastasierung hin und macht miR-21 interessant für diagnostische, prognostische aber auch therapeutische Applikationen. Die Annahme eines ursächlichen Zusammenhangs zwischen dem miR-21-Spiegel und Krebs wird durch ein *in-vivo*-Experiment von Slack

et al. gestützt.^[28] Dazu wurden Mäuse genetisch so verändert, dass sie Doxycyclin-abhängig miR-21 exprimierten. Bei induzierter Überexpression wurde ein B-CLL-artiger Phänotyp diagnostiziert. Wurde die miR-21-Expression anschließend geblockt, bildete sich der Tumor infolge von proliferativem Arrest und Apoptose zurück.

Ähnliches konnten Kumar *et al.* für die tumor-suppressiv wirkende let7-g im Mausmodell des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) nachweisen. In allen untersuchten Gewebeproben der Lungenkrebspatienten wurde eine reduzierte let7-g-Expression ermittelt, die proportional zur post-operativen Überlebenschance und antiproportional zu den Konzentrationen der Zellwachstum stimulierenden *Ras*-Proteine war. Aktivierte man die Expression von let7-g, sanken die *Ras*-mRNA- sowie Proteinlevel und die Wachstumsgeschwindigkeit des Tumors verringerte sich.^[29]

Da miRNAs zentrale Steuerelemente der Genregulation darstellen, überrascht es wenig, dass deren Dysfunktion neben Krebs auch mit anderen Krankheiten in Verbindung gebracht wird. Dazu zählen u. a. Herz-Kreislauf-,^[30] Stoffwechsel-^[31] und neurodegenerative Erkrankungen,^[32] aber auch chronische Hepatitis oder Diabetes.^[33] Ob abweichende miRNA-Expressionsmuster dort Ursache oder Folge sind, ist bis heute Gegenstand intensiver Forschungsbemühungen.

6 Als Konsequenz der mehrfach nachgewiesenen Kausalität im Zusammenhang mit Krankheiten, rückten miRNAs in den Fokus der pharmazeutischen und biotechnologischen Industrie. Zum einen gibt es Bemühungen die charakteristischen miRNA-Signaturen, welche sich in Gewebeproben oder Blutserum abbilden, als Biomarker zur Diagnose, Prognose oder zum Verfolgen der Reaktion auf eine Therapie zu nutzen.^[34] Die ersten klinischen Studien hierzu wurden bereits durchgeführt.^[35] Zum anderen wird versucht, miRNAs als neue Zielmoleküle in der Wirkstoffforschung zu etablieren.^[36] In Fällen, in denen eine miRNA stark herunterreguliert ist, wird z. B. der therapeutische Ansatz der miRNA-Ersatztherapie verfolgt. Diese zielt darauf ab, die miRNA-Funktion zu regenerieren, indem durch die Zufuhr von miRNA-Analoga die miRNA-Konzentrationen wieder auf das ursprüngliche Niveau angehoben werden.^[37] Für den umgekehrten Fall, in dem eine miRNA im Zusammenhang mit einer Krankheit abnorm hochreguliert ist, wird angestrebt, den Rückgang eines krankhaften Phänotyps durch Inhibition der miRNA-Funktion zu erreichen. In den nächsten drei Kapiteln werden verschiedene Möglichkeiten vorgestellt, um die Aktivität von miRNAs zu verändern.

2-3 | Inhibition der miRNA-Funktion durch antimiRs

2-3.1 | Grundlagen der sequenzspezifische Adressierung von miRNAs

Ein möglicher Ansatz um die Funktion einer miRNA zu inhibieren, ist die Gabe von Oligonukleotiden, die zur miRNA-Sequenz eine perfekte Komplementarität aufweisen (antimiRs). Bei diesem Prinzip wird ausgenutzt, dass miRNA im miRISC einzelsträngig

vorliegen muss, um die entsprechende Ziel-mRNA in der 3'-UTR binden zu können (vgl. Abb. 2-1). Wird der *guide strand* jedoch durch Hybridisierung mit einem komplementären Oligonukleotid in einen Duplex überführt, steht er für die Adressierung der mRNA nicht mehr zur Verfügung und die Funktion der miRNA wird inhibiert. Als Konsequenz steigt die Konzentration aller mRNAs an, die durch die adressierte miRNA reguliert werden.

Die Erforschung und Entwicklung von miRNA-basierten Therapeutika profitiert stark von den Erfahrungen auf dem Gebiet der RNA-Interferenz (RNAi), die das Prinzip der Sequenzkomplementarität zur Adressierung von mRNAs durch *short-interfering* RNAs (siRNAs) verwendet.^[38] Interessanterweise bedient sich die siRNA-Technologie zwar des gleichen intrazellulären Mechanismus zur Genregulation wie miRNAs, deren biologische Relevanz bzw. deren Verbindung mit Krankheiten war zum Zeitpunkt der RNAi-Entdeckung jedoch noch nicht zu Tage getreten.^[38]

Bei der 1998 von Fire und Mello entdeckten RNAi werden lange, doppelsträngige (ds) RNAs in die Zelle geschleust, dort ähnlich wie bei der miRNA-Reifung, von *Dicer* zu 21-23 nt-kurzen siRNAs prozessiert und in den RISC geladen (Abb. 2-2).^[39] Die Verwendung von dsRNAs > 30 nt in Säugetieren löst, unabhängig von der Sequenz und vermittelt durch die Bindung an cytoplasmische Proteinkinase-Rezeptoren, eine Interferonantwort aus, die den Mechanismus der mRNA-Translation vollständig außer Kraft setzt. Die direkte Gabe von doppelsträngigen siRNAs minimiert diesen unerwünschten Effekt.^[40] Anders als miRNAs, sind siRNAs genspezifisch, denn sie sind so konzipiert, dass sie zu einer einzigartigen Sequenz in der Ziel-mRNA perfekt komplementär sind. Bedingt durch die Vollständigkeit der Basenpaarung, wird der mRNA-Abbau durch *Ago2* eingeleitet und die siRNA kann mit weiteren Zielmolekülen interferieren (vgl. Abb. 2-1).

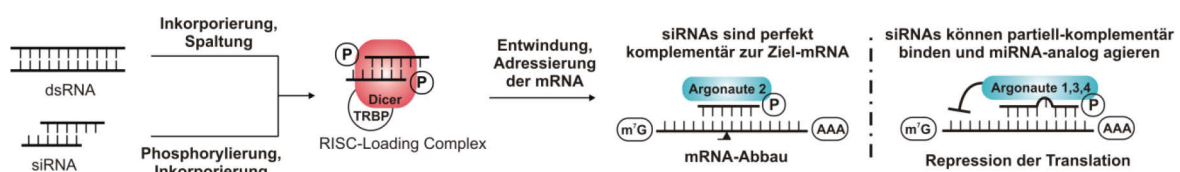


Abb. 2-2 | Wirkungsweise von siRNAs | siRNAs werden meist in der 5'-OH-Form eingesetzt und innerhalb der Zelle durch eine Kinase phosphoryliert, ds RNAs hingegen werden durch *Dicer* in kleinere siRNAs gespalten und tragen daher ebenfalls am 5'-Ende ein Phosphat.^[41] siRNAs können miRNA-analog operieren, indem sie an eine partiell-komplementäre Sequenz in der 3'-UTR der mRNA binden.

Die Kopplung von siRNAs an einen intrazellulär-vorhandenen, katalytischen Wirkmechanismus macht diese Oligonukleotide hinsichtlich Dosierung, Toxikologie und Kosten für die pharmazeutische Industrie besonders attraktiv. Die Kernprobleme der siRNA-Technologie, die effiziente Auslieferung zum Zielorgan und das anschließende Durchdringen der hydrophoben Plasmamembran (*drug delivery*), bleiben jedoch bis heute ungelöst.^[42] Daneben ist auch die vorweggenommene Genspezifität nicht immer gegeben (*off-Target-Effekte*): siRNAs können mit dem miRNA-verknüpften Mechanismus zur

Genregulation überkreuzen, da letzterer lediglich auf einer vollständigen Basenkomplementarität zwischen den ersten acht Nukleotiden am 5'-Ende und der 3'-UTR der mRNA basiert (Abb. 2-2, rechts).^[43] Keines der 20 potentiellen siRNA-Medikamente hat bisher die Marktzulassung erhalten.

Im Zusammenhang mit therapeutischen Applikationen sind neben Faktoren wie *drug delivery* und *off-Target*-Effekten auch die metabolische Stabilität, toxikologische Eigenschaften der Oligonukleotide sowie die Affinität zur Zielsequenz meist problembehaftet. Um dem zu begegnen wurde eine Reihe von Nukleinsäure-Analoga entwickelt. Gemessen an der Zahl von Medikamenten, die bisher in die Phase klinischen Studien eingetreten sind, stellen Phosphorthioate (PS),^[44] 2'-OMe-Modifikationen (OMe) sowie *Locked Nucleic Acids* (LNA), deren Ring-Flexibilität durch die eingeführte 2'-O-4'-C-Methylenbrücke stark eingeschränkt ist, die erfolgreichsten Vertreter dar (Abb. 2-3).^[45] Darüber hinaus gibt es *Peptide Nucleic Acids* (PNA), in denen das Rückgrat nicht aus Zucker-Phosphat-Einheiten, sondern peptidisch-verknüpften (2-Aminoethyl)glycin-Einheiten besteht.^[46] In der Praxis werden die benannten Modifizierungen häufig miteinander kombiniert.

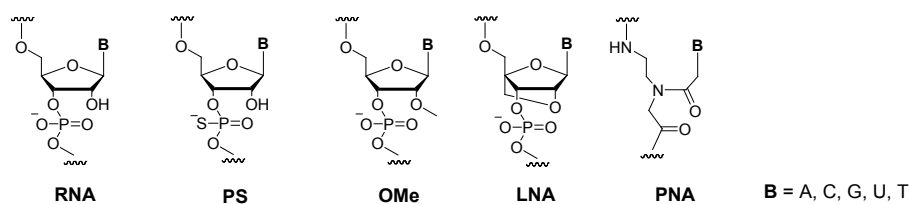


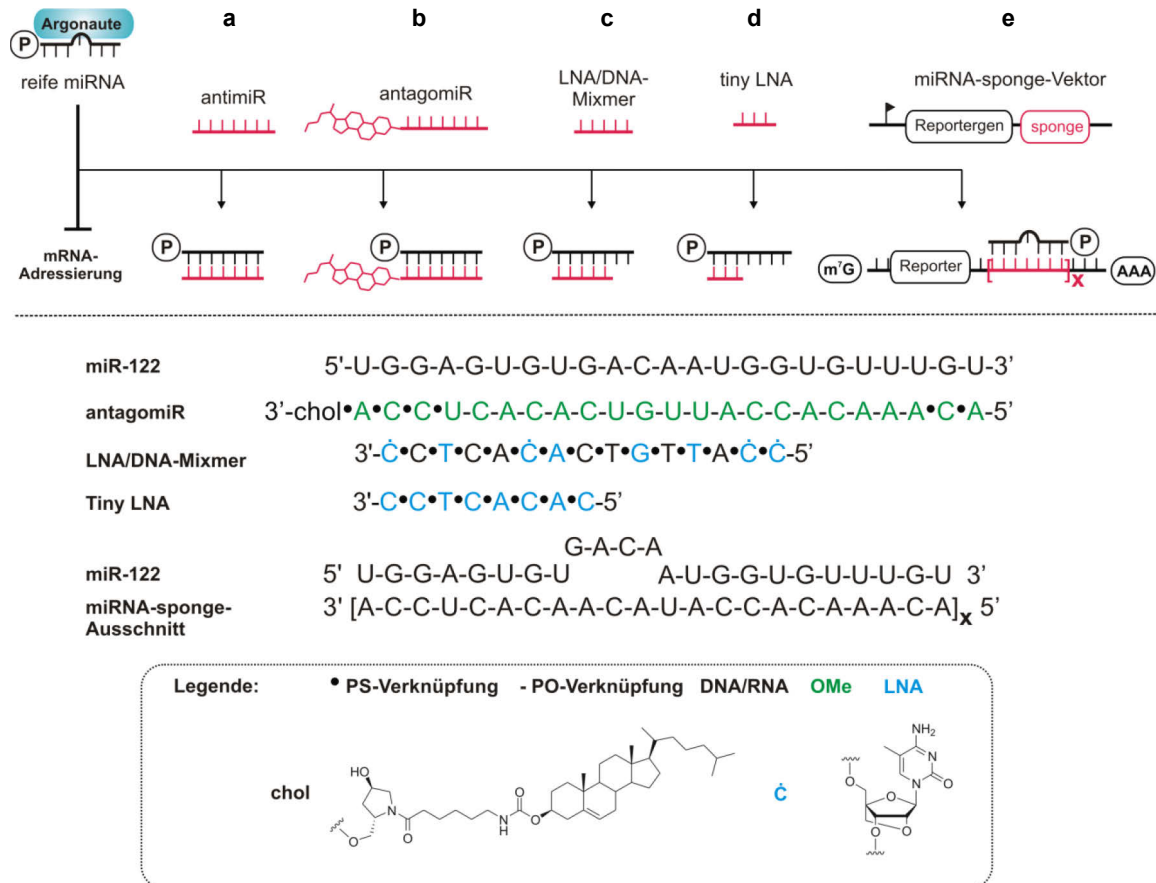
Abb. 2-3 | Strukturausschnitt von RNA und Nukleinsäure-Analoga | Durch das Substituieren eines nicht verbrückenden Sauerstoffatoms gegen Schwefel besitzen PS eine deutlich erhöhte Nukleaseresistenz und unterstützen die *in-vivo*-Distribution durch eine gesteigerte Affinität zu globulären Plasmaproteinen.^[47] Eine Methylierung an der 2'-O-Position zielt darauf ab, die C3'-*endo*-Form des Riboserings zu stabilisieren und damit die Bindung an RNA zu begünstigen. Die Nähe zum 3'-Phosphat hat außerdem einen positiven Einfluss auf die Nukleasebeständigkeit. LNAs bilden thermodynamisch einen der stabilsten Duplexe mit RNA und besitzen daher exzellente Diskriminierungseigenschaften. PNAs sind aufgrund ihrer Struktur inhärent nuklease- und proteaseresistent. Die fehlende negative Ladung führt einerseits mangels coulombscher Abstoßung zu sehr stabilen PNA-RNA-Hybriden, andererseits erschwert sie die Transfektion und das Lösen in physiologisch relevanten Medien.

2-3.2 | Beispiele für anti-miRs

Die grundsätzliche Eignung verschieden modifizierter, sequenzspezifischer anti-miRs zur Inhibierung von miRNA-Funktionen wurde bereits in mehreren Untersuchungen anhand von unterschiedlichen Ziel-miRNAs sowohl *in cellulo* als auch *in vivo* belegt. Ein sehr attraktives *Target* ist die leber-spezifische miR-122, die nicht nur in die Cholesterol-Biosynthese sondern auch in die Replikation des Hepatitis-C-Virus (HCV) involviert ist.

Die Konjugation von Cholesterol an anti-miRs (antagomiRs), stimuliert eine Interaktion mit Lipoproteinen, die als vesikuläre Cholesteroltransporter rezeptorvermittelt in die Leberzelle geschleust werden. In einem *in-vivo*-Experiment von Krützfeldt *et al.* führte die intravenöse Injektion von PS-flankierter und OMe-modifizierter antagomiR-122

(Abb. 2-4b) zu einer 23 Tage anhaltenden Unterdrückung der miR-122.^[48] Damit einher ging ein Anstieg der Konzentration von mRNAs, die in der 3'-UTR eine passende Komplementarität zum miR-122-*seed*-Motiv aufwiesen, darunter essentielle Elemente des Cholesterolverstoffwechsels. Infolgedessen sank der Cholesterolspiegel um 40 %.



nukleotids resultierten, ermöglichten eine reduzierte Dosierung, was unter pharmazeutischen Gesichtspunkten relevant ist. Ohne weitere Konjugate oder Transport-Systeme führte die systemische Injektion dieser anti-miR in der Primatengattung Grüne Meerkatze nachweislich zur Aufnahme in Leberzellen, der Bildung eines stabilen Hetero-Duplexes mit miR-122 und einer Senkung des Cholesterolspiegels um 40 %.

Motiviert durch diese Ergebnisse untersuchte die Forschergruppe die Inhibitionseigenschaften des LNA-DNA-Mixmers in HCV-infizierten Schimpansen.^[52] Wird eine Leberzelle vom HCV befallen, bindet die reife miR-122 an zwei dicht benachbarten Regionen der 5'-UTR des viralen Genoms und ermöglicht damit die Initiation der viralen Replikation, welche zu schweren Leberschädigungen führt (Abb. 2-5).^[33a] Nach Verabreichung von LNA-modifizierter anti-miR-122 nahmen die Menge an freier miR-122 um den Faktor 300 sowie der virale Titer um fast drei Größenordnungen ab. Unter dem Namen *Miravirsen* ist LNA-anti-miR-122 als erstes miRNA-basiertes Medikament in die klinische Phase eingetreten.^[53]

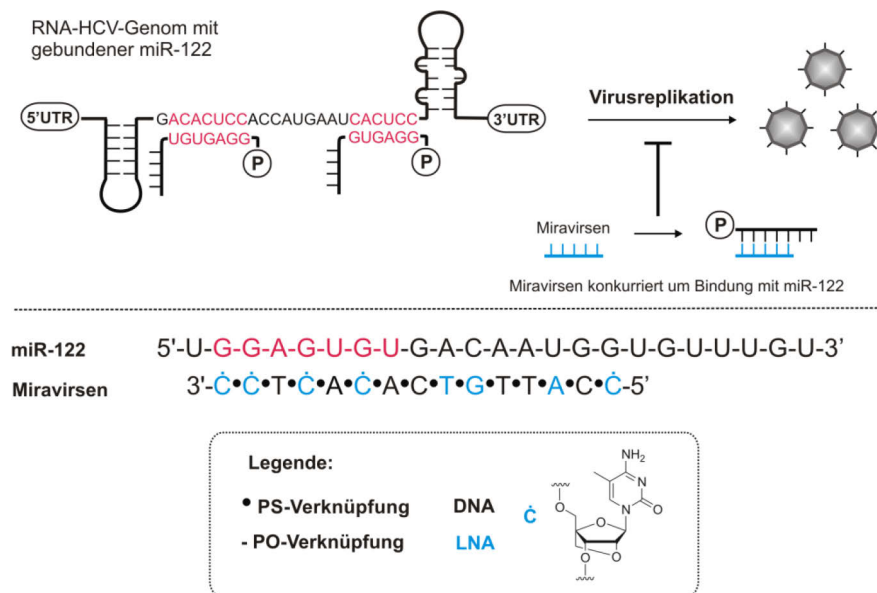


Abb. 2-5 | Adressierung des HCV-Genoms durch miR-122 | Gezeigt ist ein Ausschnitt des HCV-Genoms mit gebundener miR-122. Die komplementären Bindungsstellen sind rot markiert. Das LNA-DNA-Mixmer *Miravirsen* konkurriert mit dem viralen Erbgut um die Bindung der miR-122 und hemmt so die Virusreplikation.

Die Fortführung des zugrundeliegenden Konzepts von LNA-anti-miRs mündete schließlich in der Publikation von PS-modifizierten 8-mer-LNAs (*Tiny LNAs*), die hauptsächlich nur noch die *seed*-Region abdecken.^[50] Damit werden nicht nur die von der miR-122 regulierten mRNA-Konzentrationen manipuliert, sondern alle mRNAs, die von den Mitgliedern der adressierten miRNA-*seed*-Familie reguliert werden (Abb. 2-4d).

Auch PNA wurde bereits als miRNA-Inhibitor verwendet, allerdings deutet sich deren Potential bislang hauptsächlich in Studien mit Zelllinien an. Erst vor kurzem wurde die erste *in-vivo*-Applikation publiziert.^[54] In dieser Veröffentlichung demonstrierten Fabbri

et al. im Organismus von Mäusen die effektive Zellaufnahme von Lysin-flankierter PNA, die gegen miR-155 gerichtet war. Damit verbunden war auch ein deutlich reduzierter Spiegel an freier miR-155. Das resultierende Genexpressionsprofil stimmte mit dem von Mäusen überein, die miR-155 genetisch bedingt überhaupt nicht exprimierten. Trotz dieser vielversprechenden Resultate wird PNA für therapeutische Zwecke wahrscheinlich eher unattraktiv bleiben, denn ihre größte Hürde ist die kostenintensive Synthese, die bei den für *in-vivo*-Anwendungen benötigten Mengen voll zum Tragen kommt.

Eine Sonderform der anti-miRs sind miRNA-Schwämme (miRNA *sponges*, Abb. 2-4e). Dabei handelt es sich um intrazellulär generierte Transkripte von Vektoren, die in ihrer 3'-UTR multiple Bindungsstellen für eine spezifische miRNA anbieten. Deren Besetzung resultiert in einem Konzentrationsabfall freier, einzelsträngiger miRNA und führt zu einer verringerten miRNA-Aktivität. Bislang werden solche Konstrukte jedoch weniger für therapeutische Zwecke, sondern vorwiegend für das Studium der miRNA-Funktionen in Zellen eingesetzt. Dazu wird ein Reportergen in den Vektor integriert, dessen Expression ein Signal erzeugt, welches antiproportional zur Konzentration der entsprechenden miRNA ist.^[55]

2-4 | Modulation der miRNA-Funktion durch niedermolekulare Verbindungen

Das Fehlen von Langzeitstudien sowie distributive und pharmakologische Nachteile machen deutlich, dass die Forschung bezüglich Nukleinsäure-basierter Therapien noch am Anfang steht. Die Mehrheit aller Medikamente, die sich in der Phase klinischer Studien bzw. auf dem Markt befinden, sind niedermolekulare Verbindungen, die z. B. Proteine adressieren. Solche Substanzen sind Oligonukleotid-basierten Technologien hinsichtlich ihrer Herstellungskosten, ihrer intrazellulären Bereitstellung, dem Spektrum behandelbarer Krankheiten und der Möglichkeit einer oralen Applikation meist überlegen. Anders als sequenzspezifische Oligonukleotide, können sie jedoch mangels genauer Kenntnisse über die Ziel-Struktur nicht für jede beliebige Kavität gezielt entworfen werden. Schon minimale Veränderungen in der chemischen Struktur können Potenz, Spezifität, Dosis oder Nebenwirkungen einer neuen Verbindung drastisch verändern und über Erfolg oder Misserfolg eines Medikaments entscheiden. Um den Prozess der Medikamentenentwicklung zu optimieren, durchsucht die pharmazeutische Industrie in der Anfangsphase der Medikamentenentwicklung mithilfe von Hochdurchsatz-Screenings Substanzbibliotheken nach Leitstrukturen. Obwohl diese Bibliotheken überwiegend Verbindungen enthalten, die auf eine Bindung von Proteinen ausgerichtet sind, wurden bei diesen Screenings Substanzen gefunden, die sich für das Adressieren von RNA eignen. Darauf aufbauend hat die akademische Grundlagenforschung in der Vergangenheit einige Verbindungen präsentiert, welche in der Lage sind, miRNA-Funktionen zu beeinflussen.

Shan *et al.* analysierten 2000 durch die *Food-and-Drug-Administration* (FDA) zugelassene Verbindungen auf ihre Eignung, die miRNA-Funktion global zu manipulieren. Dabei wurde Enoxacin **1** als potenter Aktivator identifiziert.^[56] Die Vermutung, dass der Mechanismus auf einer verstärkten Prozessierung der prä-miRNAs durch Interaktion von **1** mit TRBP beruht, wurde später durch Melo *et al.* anhand des Vergleichs einzelner prä-miRNA- und miRNA-Konzentrationen sowie Experimenten mit TRBP-Mutanten bestätigt.^[57] Darüber hinaus wurde in verschiedenen humanen Krebszelllinien und Mausmodellen nach Verabreichung von **1** eine reduzierte Tumorphiliferation durch Zellzyklusarrest und Apoptose nachgewiesen. Da viele Krebserkrankungen von einer globalen Reduktion der miRNA-Expression begleitet werden, könnte Enoxacin durchaus ein vielversprechender Wirkstoff in der Krebstherapie sein.^[24]

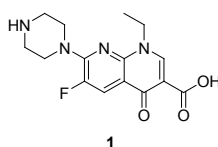


Abb. 2-6 | Struktur von Enoxacin

Ähnlich wie Enoxacin binden unspezifische Inhibitoren der miRNA-Funktion nicht direkt miRNAs, sondern Schlüsselenzyme der RNAi oder der miRNA-Biogenese. Die ersten publizierten niedermolekularen Inhibitoren von miRNA-Funktionen sind die Dihydropteridin-basierten ATP-Analoga **2** und **3**, die vermutlich den ATP-abhängigen RNA-Helikase-Schritt bei der Entwindung des miRNA-Duplexes im miRISC blockieren.^[58] Ein Screening von 530 bekannten Pharmawirkstoffen lieferte zwei weitere Inhibitoren: poly-L-Lysin Hydrobromid **4** und 3,6-Diamino-10-methylacridiniumchlorid **5**.^[59] Die genaue Wirkungsweise dieser Verbindungen ist noch ungeklärt. Es wurden aber Hinweise darauf erhalten, dass **4** die Bildung des *Dicer*-prä-miRNA- und **5** die des *Ago2*-Komplexes stört.

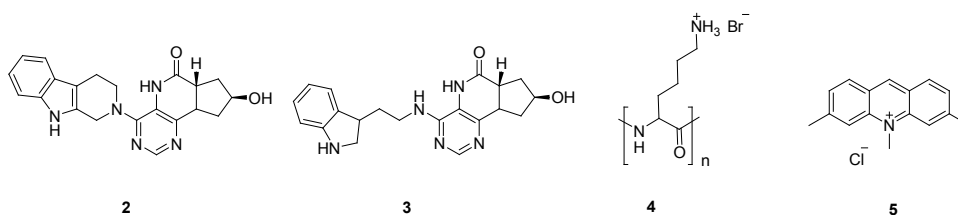


Abb. 2-7 | Strukturen von Inhibitoren der miRNA-Funktion

Unspezifische Verbindungen, welche die Funktion von miRNAs global inhibieren sind bisher vorwiegend von akademischem Interesse, denn ein therapeutischer Gewinn ist aufgrund des Zusammenhangs zwischen global reduzierten miRNA-Konzentrationen und Krebs weniger zu erwarten.^[25] Diese Tatsache treibt die Suche nach spezifischen Inhibitoren der miRNA-Aktivität voran. Gumireddy *et al.* untersuchten mehr als 1200 Verbindungen bei einer Konzentration von 10 μM auf ihren Einfluss des miR-21-Spiegels.^[60] Dabei wurde das Diazobenzenderivat **6** als potenter Inhibitor identifiziert und

diente als Ausgangspunkt für eine Strukturoptimierung, die zu dem Diazobenzenderivat **7** mit einem EC₅₀-Wert von 2 µM führte. Belege für die Spezifität von **7** zur Inhibierung der miR-21-Funktion beschränkten sich auf die Bestimmung intrazellulärer Expressionslevel von sechs weiteren mRNAs bzw. miRNAs sowie die der miR-30-Funktion, die alle durch die Zugabe von **7** unbeeinflusst blieben. Ein umfassendes Expressionsprofil wurde nicht angefertigt. Der Befund, dass nicht nur die Konzentrationen der miR-21 sondern auch der pri-miR-21 deutlich reduziert waren, lässt vermuten, dass **7** auf der Transkriptionsebene des mir-21-Gens agiert. Mit analoger Argumentation hinsichtlich Spezifität und Aktionsmodus wurden später die Verbindungen **8** und **9** als Inhibitoren der miR-122-Funktion publiziert.^[61] Beide Verbindungen konnten in HCV-infizierten humanen Leberzellen das Niveau an viraler RNA bei einer Konzentration von 10 µM um ca. 50 % senken.

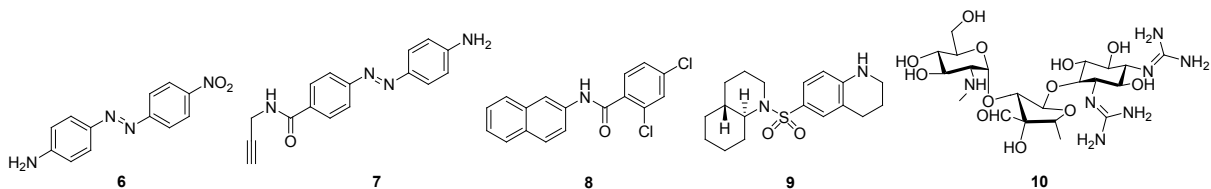


Abb. 2-8 | Strukturen von Inhibitoren einer spezifischen miRNA-Funktion

Darüber hinaus ermittelten Bose *et al.* nach Analyse von 15 Aminoglykosiden Streptomycin **10** als effektiven und spezifischen Inhibitor der miR-21-Funktion. Ein Vergleich von neun weiteren miRNA-Expressionsniveaus behandelter und unbehandelter Zellen genügte den Autoren als Beleg für die Spezifität, obgleich neben der miR-21-Konzentration, auch die der miR-27a um mindestens 50 % sank. Um die Wirkungsweise von Streptomycin zu klären, wurden UV-Denaturierungs- und *Footprinting*-Experimente durchgeführt. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen wurde geschlussfolgert, dass Streptomycin spezifisch die prä-miR-21 adressiert und dadurch die Spaltung durch *Dicer* inhibiert. In Übereinstimmung damit wurde in Anwesenheit von 2 - 5 µM Streptomycin eine um etwa 55 % gehemmte Prozessierung der prä-miR21 durch *Dicer* nachgewiesen. Eine IC₅₀-Kurve wurde nicht bestimmt. Ein Adressieren auf transkriptionaler Ebene wurde prinzipiell nicht in Betracht gezogen und eine Störung des Exports in das Cytosol per se ausgeschlossen. Mit dem Wissen, dass Aminoglykoside besonders RNA-affin sind (s. Kap 2-7), ist es prinzipiell möglich, dass Streptomycin die miR-21-Reifung durch Wechselwirkung mit der prä-miR-21 spezifisch inhibiert. Die dargebotene Nachweiskette ist bezüglich Spezifität und Wirkungsweise allerdings noch lückenhaft.^[62]

13

2-5 | prä-miRNAs als Zielmoleküle für niedermolekulare Verbindungen

Eine weitere Möglichkeit um die miRNA-Funktion zu inhibieren, ist die Verwendung von niedermolekularen Verbindungen, die an einen miRNA-Vorläufer binden und so die Prozessierung durch *Drosha* oder *Dicer* hemmen. Weil prä-miRNAs sowohl im Zellkern als

auch im Cytosol lokalisiert sind, stellt der *Dicer*-vermittelte Reifungsschritt von prä-miRNA, verglichen mit der Spaltung der pri-miRNA durch *Drosha*, einen taktisch günstigeren Angriffspunkt dar. In diesem Zusammenhang verfolgt die Arbeitsgruppe Arenz den Ansatz, die Reifung der prä-miRNA durch Bindung kleiner organischer Moleküle zu inhibieren.^[63] Da die Sequenz einer prä-miRNA einzigartig ist, weist jede von ihnen, als Konsequenz der unvollständigen Selbst-Komplementarität, ein charakteristisches Muster leicht zugänglicher Bindungsstellen auf, die für eine spezifische Wechselwirkung mit kleinen Molekülen prinzipiell zur Verfügung stehen (Abb. 2-9). Diese RNA-Bindungs-motive werden nachfolgend beschrieben.

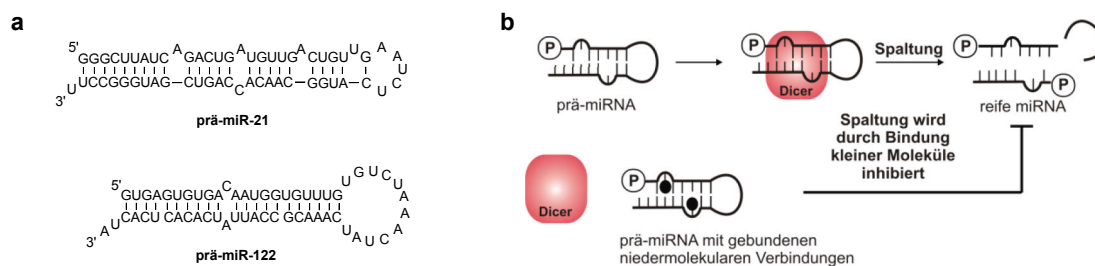


Abb. 2-9 | prä-miRNAs als Zielmoleküle für niedermolekulare Verbindungen | a Sekundärstrukturen ausgewählter prä-miRNAs, modelliert mit *Mfold*. | b Schematische Darstellung des Grundprinzips der Inhibition der miRNA-Reifung durch Bindung kleiner Moleküle an die prä-miRNA.

RNA- und DNA-Duplexe weisen deutliche Unterschiede in ihrer helikalen Struktur auf. Während RNA-Helices in den perfekt komplementären, Duplex-formenden Bereichen die A-Form einnehmen, dominiert in DNA die B-Form. Letztere unterscheidet sich durch eine tiefere und engere große Furche und gleichzeitig breitere, flachere kleine Furche deutlich von der A-Form (Abb. 2-10a, b). Dies ist eine direkte Folge der 2'-Hydroxylfunktion am Ribosegerüst von RNA, welche eine C3'-endo-Faltung stabilisiert (Abb. 2-10c). Als Konsequenz werden die 3'-Phosphodiesterbindungen so ausgerichtet, dass die Phosphatstränge in der RNA-Helix um ca. 1 Å dichter zusammenrücken.^[64] Damit verbunden ist eine Erhöhung der lokalen negativen Ladung.

Ein auffälliges Merkmal von RNA im Allgemeinen und der prä-miRNAs im Besonderen sind die Sekundärstrukturmuster, bestehend aus Ausbuchtungen (*bulges*), internen Schleifen (*internal loops*) sowie terminalen Haarnadelschleifen (*hairpin loops*) als Ergebnis partieller Selbstkomplementarität (Abb. 2-11). Solche Architekturen machen die Furchen im Vergleich zu denen der DNA nicht nur besser für kleine Moleküle zugänglich, sondern bilden gleichzeitig komplexe dreidimensionale Strukturen mit spezifischen Erkennungsoberflächen für Liganden. Diese Interaktionsbereiche sind jedoch weder starr noch mit den heutigen Möglichkeiten präzise vorhersagbar. Interne Schleifen können in Abhängigkeit von Sequenz, Größe und Symmetrie in Lösung völlig unstrukturiert vorliegen.^[65] Ausbuchtungen erhöhen häufig die Flexibilität des Phosphatrückgrats, weil ungepaarte Nukleotide nach außen gestülpt werden, sich zwischen Basenpaare der benachbarten Furche einstapeln oder sich zwischen angrenzende Nukleotide schieben und dabei ein Abknicken in der Helixachse verursachen.^[66] Selbst ein Abklappen zur

vollständigen Umhüllung eines gebundenen Liganden wurde beobachtet.^[67] Aus der hohen Dynamik von RNA-Strukturelementen ergibt sich eine große Bandbreite möglicher Tertiärstrukturen, die das Aufstellen von Regeln zum rationalen Design RNA-bindender Moleküle außerordentlich komplex gestaltet.

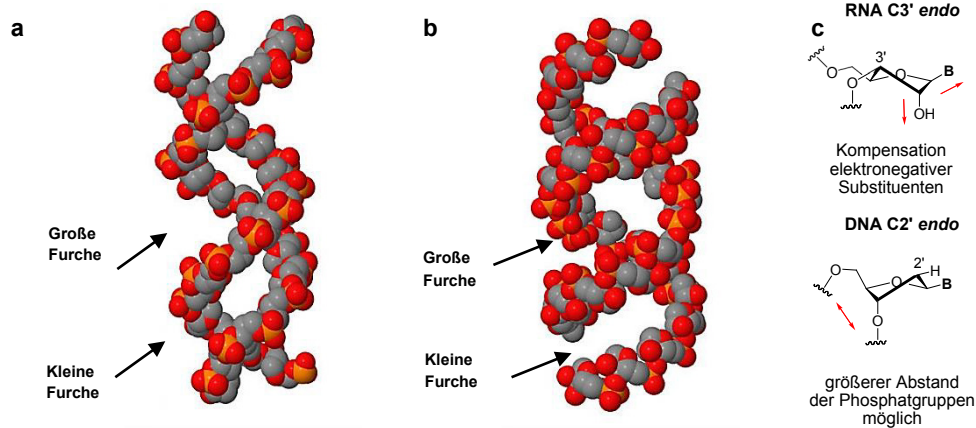


Abb. 2-10 | Strukturelle Unterschiede in der DNA- und RNA-Helix | Gezeigt sind die Molekülstrukturen von DNA- (a, PDB-ID 3BSE) und RNA-Helix (b, PDB-ID 3ND4), die aus Röntgenkristallstruktur-Analysen erhalten wurden. Zur besseren Übersicht wird nur das Rückgrat beider 16-mere gezeigt. | c Ursache der strukturellen Unterschiede ist die Faltung der (Desoxy)ribofuranose.

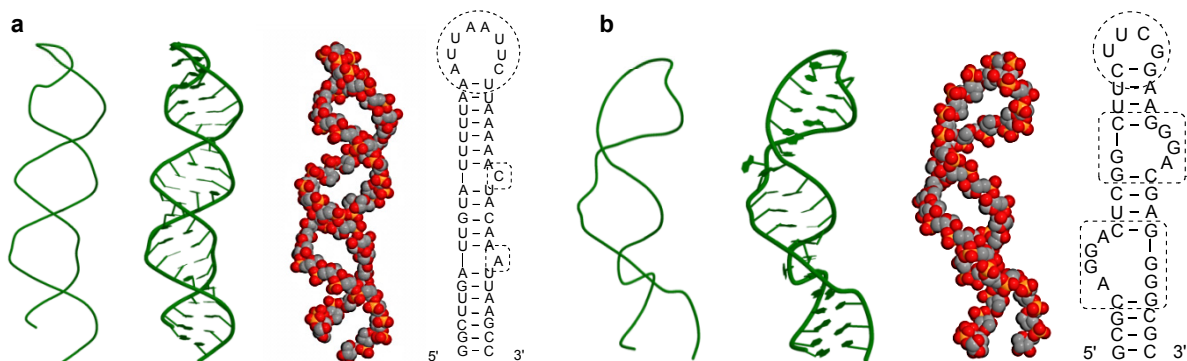


Abb. 2-11 | Typische RNA-Sekundärstrukturen | Mangels Beispielen für Molekülstrukturen von prä-miRNAs wurden zur Darstellung typischer RNA-Sekundärstrukturen die Molekülstruktur einer mRNA aus *D. melanogaster* a (PDB-ID 2KE6) und die eines RNA-Elements des HI-Virusgenoms b (PDB-ID 1M5L) abgebildet. Beide Molekülstrukturen wurden aus NMR-Struktur-Analysen ermittelt. Sie sind in verschiedenen Modi (Spur, Cartoon, Kalottenmodell des Riboserückgrats) dargestellt, zusätzlich ist die mit *Mfold* vorhergesagte Sekundärstruktur angegeben. Eine interne Schleife entsteht, wenn in einer Duplex-Region nicht-komplementäre Basen gegenüberliegen, Ausbuchtungen hingegen, wenn eine oder mehrere komplementäre Basen fehlen. Eine Haarnadelschleife ist das Resultat einer Rückfaltung von partiell-selbstkomplementären Einzelsträngen unter Bildung einer ungepaarten Schleifen- und gepaarten Stammregion.

Dass solche Sekundärstrukturelemente in den miRNA-Vorläufern prinzipiell für die Bindung von Molekülen zur Verfügung stehen, zeigen folgende Beispiele: Das Protein *Lin28* besitzt zwei RNA-Bindungsdomänen, die das *Hairpin Loop*-Motiv 5'-GGAG-3' der let7-Vorläufer erkennen und so selektiv die Prozessierung der let7-Familie durch *Drosha* oder *Dicer* hemmen (Abb. 2-12).^[68] Im Gegensatz dazu erfasst das *KH-Type Splicing Regulatory Protein* (KHSRP) 5'-guanosinreiche *Loop*-Sequenzen und fördert über einen bislang noch unbekannten Mechanismus den Reifungsprozess.^[69] Das *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A1* (*hnRNP A1*) ist ein RNA-bindendes Protein, welches

gleichzeitig den terminalen *Loop*- und Stammbereich der pri-miR-18a bindet und so zu einer Relaxierung der Duplexstruktur führt, die eine nukleolytische Spaltung aus dem Primärtranskript erleichtert. In all diesen Beispielen nutzen RNA-bindende Proteine die *Loop*-Bereiche, um die Reifung von miRNAs zu inhibieren oder zu aktivieren. Die Strategie, die Reifung von miRNAs durch Bindung kleiner Moleküle an die Bindungstaschen der miRNA-Vorläufer zu inhibieren, folgt diesem intrinsischen Mechanismus.

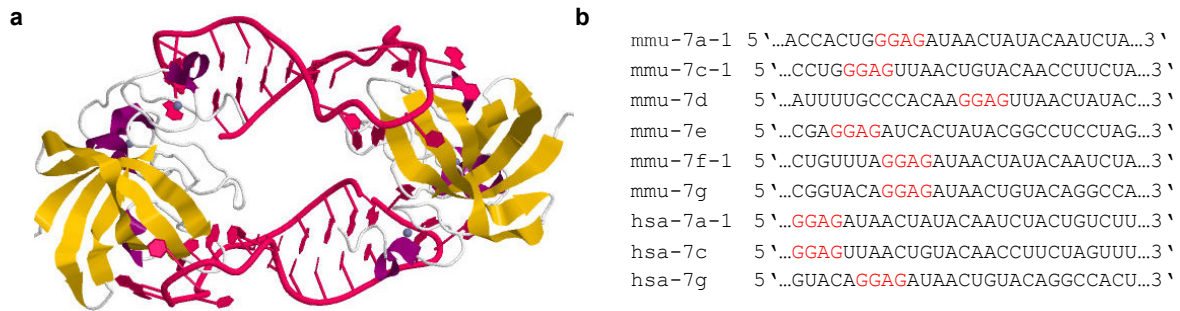


Abb. 2-12 | Wechselwirkung zwischen *Lin28A* und prä-let-7g | **a** Die Molekülstruktur von *Lin28A*, gewonnen aus einer Röntgenkristallstruktur-Analyse, zeigt die zwei RNA-Bindungsdomänen des *Lin28A*-Proteins aus *Mus Musculus* (mmu, Hausmaus, PDB-ID 3TS2), das die *Loop*-Sequenz 5'...GGAG...3' der prä-let7g bindet und dadurch die prä-let7g-Reifung inhibiert. | **b** Das Sequenzmotiv 5'...GGAG...3' ist u. a. in den prä-let7-Familien von *Mus Musculus* und *Homo Sapiens* (hsa) hochkonserviert.

2-6 | Peptide und Peptoide als Binder von prä-miRNA

- 16 Natürliche Vorbilder wie z. B. *Lin28* legen nahe, Peptide oder peptidähnliche Strukturen als prä-miRNA-Binder zu nutzen. Krishnamurthy *et al.* implementierten dazu ein 2-Phenylchinolinderivat in ein cyclisches Peptid (Abb. 2-13a) und untersuchten dessen Interaktion mit verschiedenen, partiell selbst-komplementären RNAs.^[70] Die gemessenen Dissoziationskonstanten (K_D -Wert) überspannten dabei einen breiten Bereich von 0.05 - 10 μ M und führten zu der Schlussfolgerung, dass der Makrozyklus, vermittelt durch den Heterozyklus, bevorzugt an RNA-Stellen bindet, die das Muster 5'-Pyrimidin-Purin-3'-*bulge* enthalten. Neben artifiziellen RNAs konnte auch eine Bindung an die prä-miR-23b nachgewiesen werden, jedoch wurde nicht gezeigt, dass das auch die Inhibierung der miRNA-Reifung zur Folge hatte.

Es kann sehr mühselig sein, eine Substanzbibliothek *de novo* aufzubauen, die divers und groß genug ist um mit hoher Wahrscheinlichkeit Binder für eine Zielstruktur zu finden. Einen Ausweg bietet die kombinatorische Synthese, bei der ein Satz von Grundbausteinen systematisch variierend durch eine wiederholte, möglichste effiziente Verknüpfungschemie kombiniert wird. Diese Methode nutzten Chirayil *et al.* um eine Bibliothek von 7680 *N*-substituierten Oligoglycinen (Peptoide) aufzubauen, die auf ihre Eignung als Binder für die prä-miR-21 untersucht wurden.^[71] Die Optimierung einer ersten Leitstruktur führte zur Entdeckung des Peptoids **11**, dessen K_D -Wert von 1.9 μ M sich um den Faktor 20 von dem einer strukturell ähnlichen Kontroll-RNA unterschied. Die tatsächliche Inhibition der miRNA-Reifung wurde nicht nachgewiesen.

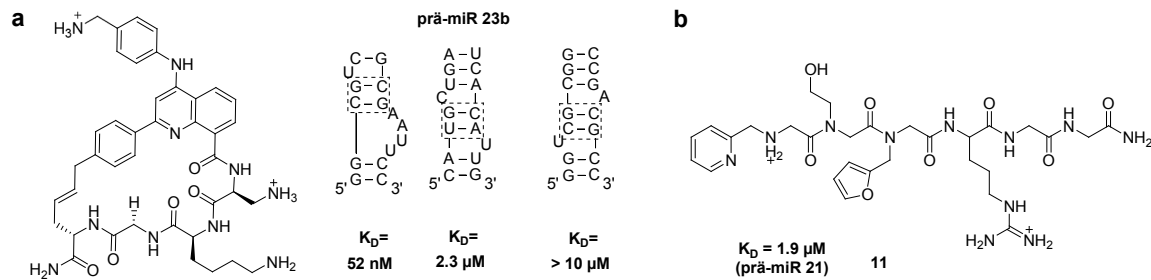


Abb. 2-13 | Cyclische Peptide und Peptoid als Binder von prä-miRNA | **a** Die Präferenz des peptidischen Makrozyklus für 5'-Pyrimidin-Purin-3'-Interkalationsstellen in Nachbarschaft zu einem 3'-*bulge* (fett markiert), spiegelt sich in den stark differierenden Dissoziationskonstanten verschiedener RNA-Strukturen wider. | **b** Struktur des Peptoids **11**.

2-7 | Aminoglykoside als Binder von prä-miRNA

Aminoglykoside binden an RNA mit K_D-Werten im μM Konzentrationsbereich und eignen sich daher prinzipiell als Binder von prä-miRNA-Sekundärstrukturen. Weil die miRNA-Forschung aber noch sehr jung ist, gibt es bisher nur wenige Studien über die Wechselwirkungen von Aminoglykosiden mit prä-miRNAs. Neben dem von Bose *et al.* identifizierten Streptomycin als Inhibitor der prä-miR-21-Funktion,^[62] untersuchten Maiti *et al.* vor kurzem Aminoglykoside auf ihre Fähigkeit an die prä-miR-155 zu binden.^[72] Dabei wurde einerseits, anhand von erhöhten prä-miRNA-Schmelztemperaturen und mittels K_D-Werten im μM Konzentrationsbereich, eine Bindung der Aminoglykoside an die prä-miR-155 nachgewiesen, andererseits inhibierte keine der Verbindungen bei einer Konzentration von 1 mM die Reifung der prä-miR-155.

17

Im Gegensatz zu den wenig bekannten Beispielen für prä-miRNAs, wurde die Bindung von Aminoglykosiden an bakterielle, virale oder katalytische Ziel-RNAs sehr gründlich untersucht. Ausgehend von der Annahme, dass sich die dort dokumentierten Ergebnisse generalisieren und auf prä-miRNAs übertragen lassen, werden in diesem Kapitel Aminoglykoside als generelle Binder von RNA-Sekundärstrukturen vorgestellt.

2-7.1 | Aminoglykoside als Binder von RNA-Sekundärstrukturen

Aminoglykoside gehören zu den Antibiotika und werden, trotz der Feststellung zunehmender bakterieller Resistenzen sowie ihrer Nephro- und Ototoxizität bis heute für die Behandlung bakterieller Infektionen unter klinischer Kontrolle eingesetzt.^[73] Sie hemmen die bakterielle Proteinbiosynthese, indem sie an den internen *Loop* der *A-Site* der 16S rRNA in der ribosomalen 30S-Untereinheit binden (Abb. 2-14a). Dort befindet sich die Dekodierungsstelle, welche die Übereinstimmung des mRNA-Tripletts mit dem Anticodon der *transfer*-RNA (tRNA) durch direkte Interaktion der beiden ungepaarten Adeninbasen kontrolliert. Die Bindung eines Aminoglykosids im *A-Site-Loop* friert die Beweglichkeit dieser Basen ein (Abb. 2-14b), stört infolgedessen den Kontroll-Lesemechanismus und begünstigt die Bildung nicht-funktionaler Proteine.^[74] Je nach eingesetzt-

tem Aminoglykosid werden zusätzlich eine Hemmung der Initiator-Komplexbildung oder des Translokationsschrittes als Wirkmechanismen diskutiert.^[75]

Eine Auswahl klinisch relevanter Aminoglykoside ist in Abb. 2-14c abgebildet. In allen gezeigten Verbindungen ist das hochkonservierte 2-Desoxystreptamin (2-DOS) enthalten, das sich biosynthetisch von D-Glucose-6-Phosphat ableitet. Neben einer 1,3-Diaminofunktionalität besitzt das Cyclitol-derivat zusätzlich drei Hydroxylgruppen, die an den Positionen 4,5-*O,O* oder 4,6-*O,O* mit variablen Aminoglykosiden konjugiert sind. Die Aminogruppen sind unter physiologischen Bedingungen protoniert.^[76]

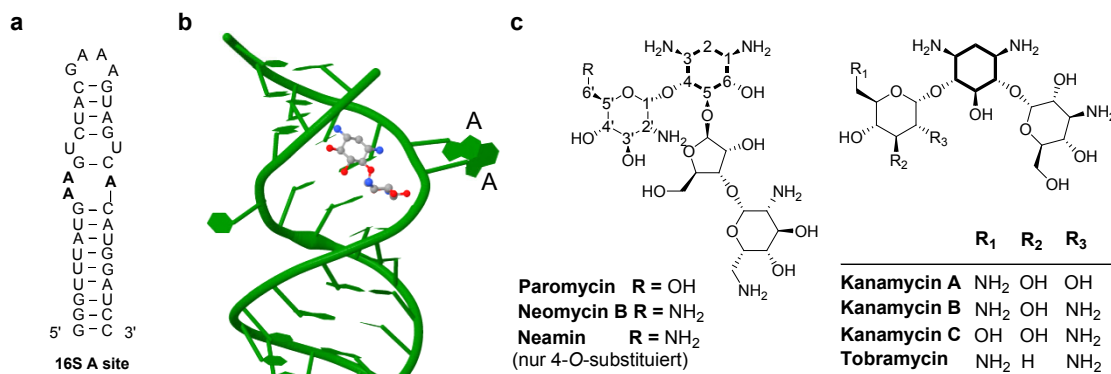


Abb. 2-14 | Wirkungsweise und Strukturbeispiele von Aminoglykosiden | **a** Mit *Mfold* berechnete Sekundärstruktur der 16S-A-Site von *E. coli*, die Adeninbasen der Dekodierungsstelle sind fett markiert. | **b** Die Bindung von Neamin an ein Oligonukleotidmodell der 16S-A-Site von *E. coli*, führt zur permanenten Ausstülpung zweier Adeninbasen (PDB-ID 2ET8) und blockiert dadurch deren Kontroll-Lesefunktion. | **c** Auswahl klinisch relevanter Aminoglykoside, das 2-Desoxystreptamingerüst ist fett markiert, links: 4,5-*O,O*-disubstituiertes 2-DOS, rechts: 4,6-*O,O*-disubstituiertes 2-DOS.

Neben den Wechselwirkungen von Aminoglykosiden mit bakterieller RNA wurde auch die Bindung an RNAs der HI-1-Virusreplikation sehr ausführlich studiert. Zum einen an der *Trans-Activating-Response*-RNA (TAR-RNA), die in der 5'-UTR viraler mRNAs lokalisiert ist und im Zusammenspiel mit dem *Tat*-Protein die Effizienz der viralen Transkription steigert. Zum anderen an dem *Rev Response Element* (RRE), das durch Assoziation mit dem *Rev*-Protein den nuklearen Export der viralen mRNA in das Cytoplasma des Wirts verstärkt. Die Interaktion zwischen RNA und Protein basiert in beiden Fällen auf der Erkennung eines asymmetrischen internen *Loops* (Abb. 2-15).^[77] Sowohl für die TAR- als auch RRE-RNA wurde *in vitro* gezeigt, dass Aminoglykoside mit dem *Tat*- bzw. *Rev*-Protein um die bevorzugten Bindungsstellen in den Ziel-RNAs konkurrieren können. Neomycin B inhibiert die *Tat*-TAR-Interaktion mit einer halb-maximalen Inhibitor-konzentration (IC₅₀-Wert) von 0.92 µM besonders potent, allerdings nicht kompetitiv, sondern allosterisch durch Wechselwirkung mit einer kleinen Furche nahe des internen *Loops* (Abb. 2-15b).^[78] Auch für die RRE-RNA beobachtete man bei der Verwendung von Neomycin B eine starke Bindung im unteren Duplexbereich, jedoch ohne inhibitorischen Effekt. Wurde die Konzentration des Aminoglykosids erhöht, so konnte ein zusätzliches Bindungsereignis in der *Loop*-Region detektiert werden, welches die Assoziation des *Rev*-Proteins kompetitiv hemmt.^[79]



Abb. 2-15 | Bindungsstellen von TAR- und RRE-RNA | a Mit *Mfold* vorhergesagte Sekundärstrukturen von TAR- und RRE-RNA, die sog. *high affinity binding sites* für die Bindung von *Tat* bzw. *Rev* sind fett markiert. | b Der Vergleich von Molekülstrukturen aus NMR-Strukturanalysen zwischen ungebundener (links, PDB-ID 1QD3) und durch Neomycin gebundener HIV-1-TAR-RNA (rechts, PDB-ID 1ANR) illustriert die erzwungene Reorganisation der RNA nach Bindung des Aminoglykosids. | c Gezeigt ist die Bindung zwischen dem *Rev*-Peptid und RRE-RNA (PDB-ID 1ETG). Neomycin B bindet stammabwärts dieser Region.

2-7.2 | Grundlagen der RNA-Erkennung durch Aminoglykoside

Die Beobachtung des vorangegangenen Abschnitts, dass Neomycin B mit K_D -Werten im μM Konzentrationsbereich sowohl an 16S rRNA, TAR- als auch RRE-RNA bindet, weist auf das Hauptproblem bei der Adressierung von RNA durch Aminoglykoside hin – die fehlende Spezifität. Um Ansatzpunkte für Strukturoptimierungen zu finden, die dieses Problem lösen könnten, wurden die generellen Prinzipien bei der RNA-Erkennung eingehend erforscht.

19

Die Interaktion zwischen Aminoglykosiden und RNA basiert im Wesentlichen auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den protonierten Aminofunktionen und dem anionischen Phosphatrückgrat. Die im Vergleich zur DNA-A-Helix erhöhte negative Ladungsdichte am Rückgrat (vgl. Kap. 2-5) ist Kernpunkt der generellen Affinität zu RNA und zugleich der fehlenden Spezifität, da elektrostatische Wechselwirkungen nicht gerichtet sind. Die Gesamtladung von Aminoglykosiden kann über Anzahl bzw. Derivatisierung der Aminofunktionen und durch Anzahl bzw. Position der Hydroxylgruppen beeinflusst werden.^[80] Neben den elektrostatischen Wechselwirkungen werden auch gerichtete Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet, die aber nur über kurze Distanzen wirken und dabei Pseudo-Basenpaarungen zwischen ungepaarten Nukleobasen und Hydroxyl- sowie Aminogruppen erzeugen (Abb. 2-16). Auch eine Interaktion mit gepaarten Nukleobasen ist grundsätzlich möglich.^[81] Je nach Anzahl, räumlicher Anordnung und Stärke der Wechselwirkungen können diese Wasserstoffbrückenbindungen lokal eine definierte Ausrichtung des koordinierenden Aminoglykosids bewirken. Entscheidend dafür ist die Fixierung von Wasserstoffbrücken-Donoren auf Sechsringen, die einerseits konformationsflexibel sind und andererseits über wenige innere Freiheitsgrade verfügen, sodass die positiven Ladungen zugleich gerichtet und adaptiv verteilt werden

können.^[80] Zusätzlich wurde in einigen RNA-Aminoglykosid-Komplexen festgestellt, dass Aminoglykoside nicht nur an RNA koordinieren, sondern darüber hinaus auch eine Reorganisation der RNA forcieren können, mit dem Ergebnis, dass das Aminoglykosid vom RNA-Duplex umhüllt wird (Abb. 2-15b, Abb. 2-16b).^[82]

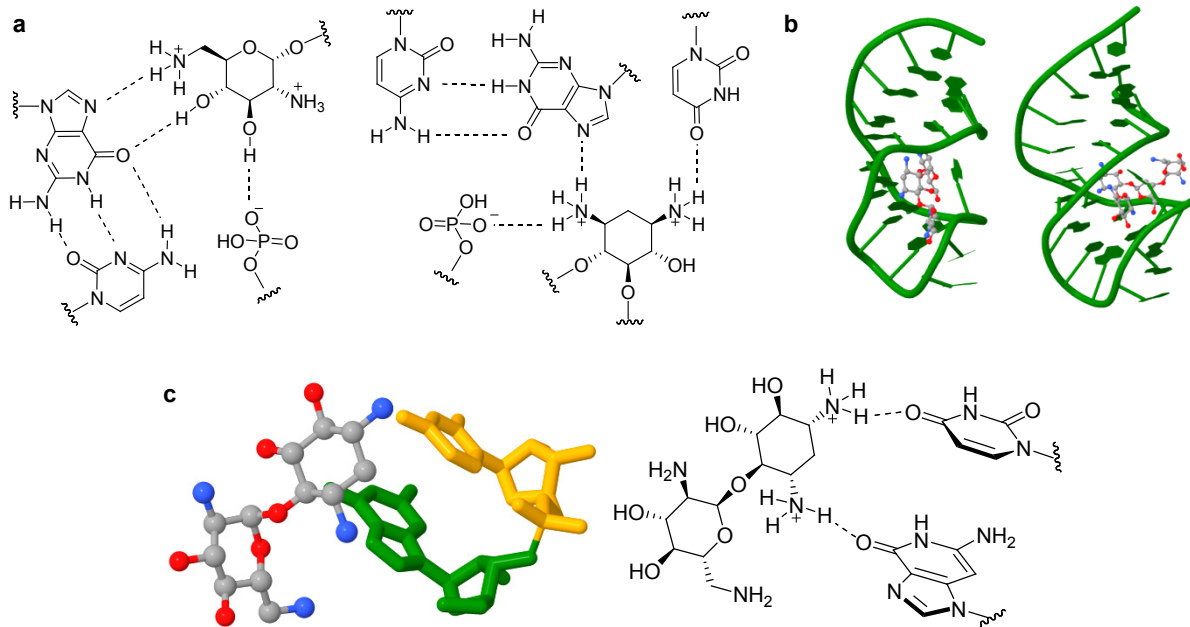


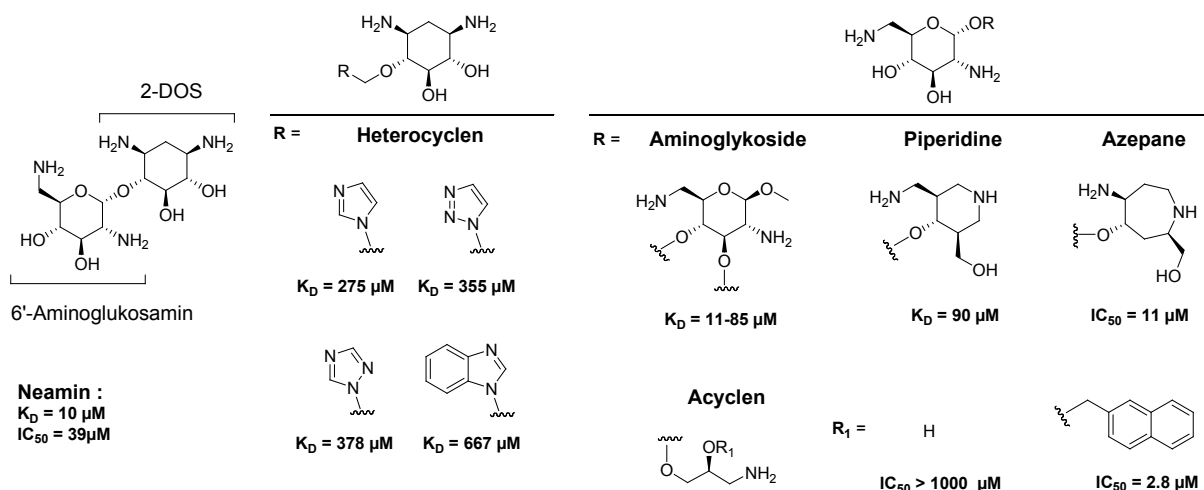
Abb. 2-16 | Beispiele für Wechselwirkungen zwischen Aminoglykosiden und RNA | **a** Dargestellt sind mögliche Wechselwirkungen zwischen Aminoglykosiden und Nukleobasen bzw. dem Phosphatrückgrat. Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien markiert.^[81b] | **b** Die Wechselwirkung von Aminoglykosiden führte in einem RNA-Aptamer-Tobramycin-Komplex (links, PDB-ID 2TOB) sowie in einem RNA-Aptamer-Neomycin-B-Komplex (rechts, PDB-ID 1NEM) zu einer Reorganisation der RNA-Struktur. | **c** GU-spezifische Erkennung durch das 2-DOS-Gerüst, exemplarisch illustriert an der internen *Loop*-Region der 16S-*A-Site*-RNA im Komplex mit Neamin (PDB-ID 2ET8), Wasserstoffbrückenbindungen sind durch gestrichelte Linien markiert.

NMR-Strukturanalysen von RNA mit gebundenen Aminoglykosiden haben zudem sequenzspezifische Erkennungselemente offenbart. Beispielsweise wurde häufig eine Wechselwirkung zwischen 2-DOS und Basenstapeln beobachtet, die das Motiv 5'-GU/UG/GG-3' in unmittelbarer Nähe einer Schleife aufwiesen (Abb. 2-16c).^[83] Des Weiteren zeigen die Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von Disney, dass auch die an das 2-DOS konjugierten Aminoglykoside einen Einfluss auf eine sequenzabhängige Bindung an RNA ausüben können. Nach dem Durchsuchen von Bibliotheken interner und terminaler Schleifen auf Präferenzen für immobilisierte Aminoglykoside, wurde z. B. für einem 6-mer-*Hairpin-Loop* aufgezeigt, dass Kanamycin A bevorzugt das Sequenzmotiv 5'-UNNNC-3' und Neomycin B vorwiegend das Sequenzmotiv 5'-UNNG-3' adressieren (N = beliebiges Nukleotid A, C, G oder U).^[84] Interne *Loops* komplexieren Neomycin B dann besonders stark, wenn sich G und A gegenüberliegen, wohingegen für Tobramycin GG-Paare und für Kanamycin A allgemein pyrimidinreiche Sequenzen die Bindungsaffinitäten steigern.^[85]

2-7.3 | Derivatisierung von Aminoglykosiden

Das Studium der RNA-Erkennung ging einher mit der Veröffentlichung einer unüberschaubaren Anzahl chemisch modifizierter Neomycin-, Kanamycin-, Paromomycin- sowie Tobramycinderivate.^[86] Mit der Intention Affinität und Selektivität bei der RNA-Adressierung zu verbessern, wurden mit unterschiedlichem Erfolg Position und Anzahl der Amino- bzw. Hydroxylgruppen variiert oder es wurden zusätzlich Guanidiniumgruppen eingeführt.^[80, 87] Angesichts der vielen funktionellen Gruppen, zwischen denen chemisch nur schwer differenziert werden kann, war dies stets mit einem hohen synthetischen Aufwand verbunden. Dem wurde versucht entgegenzuwirken, indem stattdessen kleinere Ringsysteme verwendet wurden, die durch Acidolyse der Aminoglykoside erhalten werden können. Die elementare Rolle des hoch konservierten 2-DOS-Motivs für die RNA-Erkennung sowie die Tatsache, dass Neomycin B als Ausgangsstoff in großen Mengen zu einem günstigen Preis zur Verfügung steht, erklären die besonders hohe Zahl an Publikationen für Neamin- bzw. 2-DOS-Derivatisierungen. So wurde beispielsweise versucht, im Neamin den 6'-Aminoglukosaminring durch Heterocyklen wie Imidazol, Triazol oder Purin zu imitieren (Abb. 2-17).^[88] Andersherum wurde 2-DOS u. a. durch ein zweites Aminoglykosid ersetzt bzw. stattdessen Azepane, Piperidin bzw. acyclische Strukturen konjugiert.^[89] Letztgenannte Derivatisierung resultierte in einer Verschlechterung der Dissoziationskonstanten. Erst zusätzliche aromatische Reste konnten den fehlenden 2-DOS-Ring unter Ausnutzung des π -Stackings und weiterer Wasserstoffbrückenbildner teilweise kompensieren. Aufgrund dieser bindungsfördernden Effekte wurden Interkalatoren häufig als Modifizierungen in Aminoglykosiden und deren Substrukturen eingesetzt.^[90]

21



Nukleotidyltransferasen sowie Acetyltransferasen modifizieren Aminoglykoside derart, dass ihre Affinität an die 16S rRNA reduziert und infolgedessen ihre Wirksamkeit, die bakterielle Proteinbiosynthese zu inhibieren, eingeschränkt wird.^[93] Neben präventiv eingeführten *N*-Acylierungen hat sich auch das Dimerisieren von Aminoglykosiden als wertvoller Beitrag erwiesen, um den Erkennungssystemen der bakteriellen Verteidigung auszuweichen.^[91, 94]

2-7.4 | Dimerisierte Aminoglykoside als Binder von RNA-Sekundärstrukturen

Pionierarbeit auf dem Gebiet dimerisierter Aminoglykoside leisteten Tor und Wang Ende der 1990er Jahre, die damit zunächst die Absicht verfolgten, die molekularen Grundlagen der RNA-Aminoglykosid-Interaktion besser zu verstehen. Aus der Beobachtung, dass völlig verschiedene RNAs Aminoglykoside nicht in Abhängigkeit der Sequenz binden, sondern vermutlich RNA-Strukturmuster erkennen, schlussfolgerten sie, dass innerhalb einer großen RNA koexistierende Bindungsstellen sehr wahrscheinlich sind.^[95] Demnach würde eine kovalente Verknüpfung von Aminoglykosiden einen kooperativen Effekt bei der Interaktion begünstigen, was sich in deutlich gesteigerten Bindungsaffinitäten widerspiegeln sollte. Daher wurden Tobramycin, Kanamycin A und Neomycin durch einen hydrophilen, flexiblen Linker miteinander verknüpft. Dies führte, im Vergleich zur Gabe der entsprechenden Monomere, tatsächlich zu einer deutlich gehemmten Prozessierung des *Hammerhead*-Ribozyms.^[96] Diese richtungsweisende Arbeit inspirierte viele Arbeitsgruppen zur Synthese bivalenter Aminoglykoside.

In der Annahme, dass Neamin-Dimere sowohl schlechte Substrate für Aminoglykosid-modifizierende Enzyme als auch stark affine Moleküle zur Adressierung der 16S rRNA seien, synthetisierten Suheck *et al.* Neamin-Dimere.^[91] Dazu wurde über acht Reaktionsstufen, ausgehend von Neomycin B, 5-*O*-Carboxyethylneamin synthetisiert, das anschließend durch bivalente, hydrophobe Aminolinker dimerisiert wurde (Abb. 2-18a). Zwar zeigten diese Konjugate an einem *A-Site*-RNA-Modell mit K_D -Werten im Bereich von 2 μM im Vergleich zum Neamin mit $K_D = 10 \mu\text{M}$ eine moderat gesteigerte Affinität, jedoch wurde die Bindungsstöchiometrie mit 2:1 bestimmt. Dies kann möglicherweise damit erklärt werden, dass sich die unpolaren Alkylketten im Wasser aufgrund des hydrophoben Effekts „ineinander lösen“ und so ein kooperatives Erkennen benachbarter RNA-Sekundärstrukturen hemmen. Der Ersatz durch hydrophile Aminoalkohollinker resultierte in den erwarteten 1:1 Bindungsstöchiometrien und K_D -Werten von bis zu 40 nM. Darüber hinaus wurde für drei Verbindungen gezeigt, dass sie wie erwartet, nicht nur schlechte Substrate Aminoglykosid-modifizierender Enzyme sind, sondern dass sie gegenüber bakteriellen Phospho- und Acetyltransferasen sogar eine inhibitorische Wirkung entfalten.

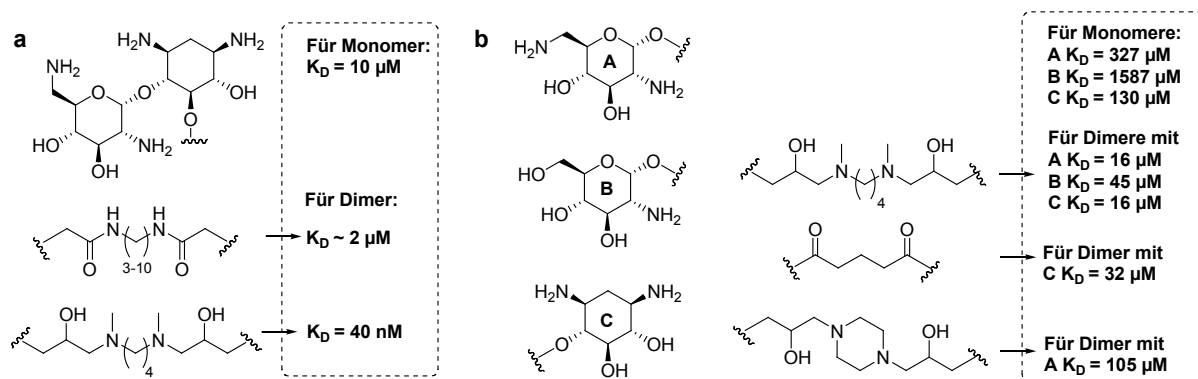


Abb. 2-18 | Auswahl dimerisierter Aminoglykoside und 2-DOS-Konjugate | Im Vergleich zu den monomeren Einheiten führen sowohl Dimerisierungen von Neamin (a) als auch 6'-Aminoglucosamin, Glukosamin oder 2-DOS (b) zu einer Steigerung der Bindungsaffinität an die 16S-A-Site-RNA.

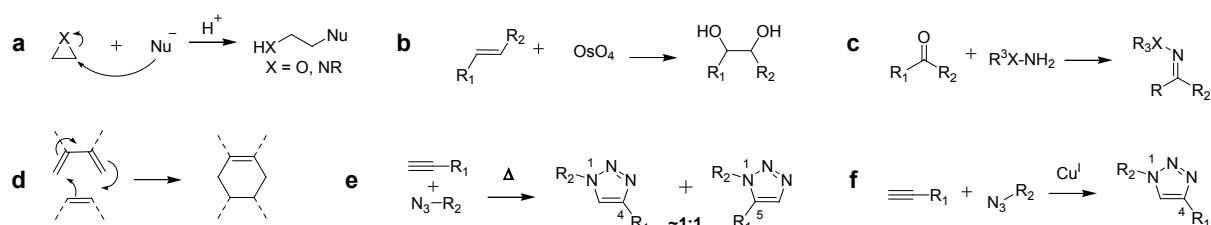
Motiviert durch den Erfolg der Neamin-Dimere und bestrebt, den synthetischen Aufwand für die regioselektive Einführung von Linkern zu reduzieren, untersuchten He *et al.*, ob sich das Prinzip der Dimerisierung auch auf Substrukturen des Neamins übertragen lässt.^[97] Hierfür wurden in sechs Stufen Epoxid-modifizierte 2-DOS-, Glukosamin- und 6'-Aminoglucosamin-Monomere synthetisiert, die durch Aminierung mit verschiedenen langen Bisaminoalkohollinkern miteinander verbunden wurden (Abb. 2-18b). Für alle Dimere sowie Monomere wurden die Dissoziationskonstanten an 16S rRNA bestimmt. Zwar wies keines der Dimere niedrigere K_D -Werte als die korrespondierenden Neamin-Verbindungen auf, jedoch zeigten alle gesteigerte Bindungsaffinitäten im Vergleich zu den monomeren Einheiten, was die Universalität des Konzepts der Dimerisierung unterstreicht. Zusätzlich wurde der Trend beobachtet, dass die K_D -Werte mit zunehmender Linkerlänge sinken, wahrscheinlich als Folge eines erleichterten Abtastens der RNA-Umgebung, was die Wahrscheinlichkeit beim Auffinden einer zweiten Bindungsstelle erhöht. Jedoch lag der 4-O-konjugierte 2-DOS-Baustein aufgrund der Reaktionsführung als Racemat vor. Die Stereoinformation des 2-DOS kann aber angesichts der gewonnenen Kenntnisse über RNA-Wechselwirkungen durchaus relevant sein.^[92] Darüber hinaus erscheint die Synthese der 23 getesteten Verbindungen trotz der Fokussierung auf kleinere Ringsysteme immer noch sehr aufwändig, was insbesondere beim Aufbau größerer Substanzbibliotheken hinderlich ist.

23

2-7.5 | Multivalente Verknüpfung von Aminoglykosiden durch CuAAC

Die kupferkatalysierte Azid-Alkin 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC) ist eine Variante der „Click-Chemie“. Dieser Terminus wurde 2001 von Sharpless eingeführt und fasst alle modularen Reaktionen zusammen, deren Anwendung breit, komfortabel sowie simpel ist und die sich darüber hinaus durch hohe Ausbeuten, leicht zu trennende Produktgemische und Stereospezifität auszeichnen.^[98] Typische Beispiele sind nukleophile Ringöffnungsreaktionen an gespannten Heterocyclen wie Epoxiden oder Aziridinen, Additionen an Mehrfachbindungen wie Dihydroxylierungen, Carbonyl-Reaktionen vom Nicht-Aldol-Typ und auch Cycloadditionen wie die Diels-Alder-Reaktion oder die

1,3-dipolare Cycloaddition nach Huisgen (Abb. 2-19).^[99] Letztere war schon lange bekannt, erforderte aber in der Regel hohe Reaktionstemperaturen und resultierte meist in einem Gemisch aus 1,4- und 1,5-Regioisomeren. Erst die Entdeckung von Sharpless und Meldal, dass Cu^{I} -Salze die Reaktion in Richtung des 1,4-Regioisomers drängen und zudem milde Reaktionstemperaturen ermöglichen, machte die CuAAC zur „*Cream of the Crop*“ unter den Click-Reaktionen.^[100] Dies umso mehr, als es gelang, die Reaktionsgeschwindigkeit durch Zugabe von Kupfer-komplexierenden Liganden wie TBTA oder wasserlöslichem THPTA (Abb. 2-20) noch weiter zu steigern.^[101] Es wird vermutet, dass diese vierzähligen Liganden das oxidationsempfindliche Cu^{I} -Ion schützend umhüllen, solche Komplexe aber labil genug sind um die Bildung des Cu^{I} -Acetylids nicht zu hemmen. Zugleich erhöhen sie durch ihre Koordination die Elektronendichte am Reaktionszentrum.^[102] Ein vorgeschlagener CuAAC-Mechanismus, vermittelt durch einen vierzähligen Liganden, wird in Abb. 2-20 dargestellt.



24 **Abb. 2-19 | Klassifizierung von Click-Chemie-Reaktionen** | **a** Nukleophile Ringöffnungsreaktionen an Epoxiden, Aziridinen | **b** Additionen an Mehrfachbindungen, z. B. Dihydroxylierung | **c** Carbonyl-Reaktionen vom Nicht-Aldol-Typ, z. B. Bildung von Oximen, Hydrazinen | **d** Cycloaddition, z. B. Diels-Alder-Reaktion | **e** 1,3-dipolare Cycloaddition nach Huisgen | **f** 1,3-dipolare Cycloaddition nach Sharpless und Meldal.

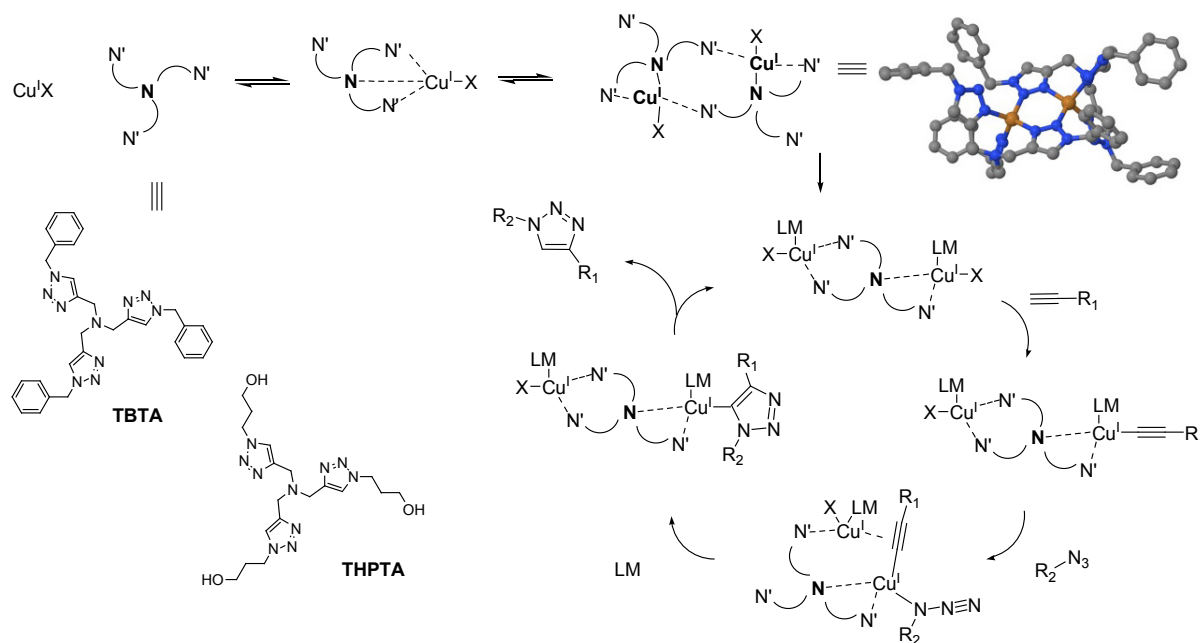
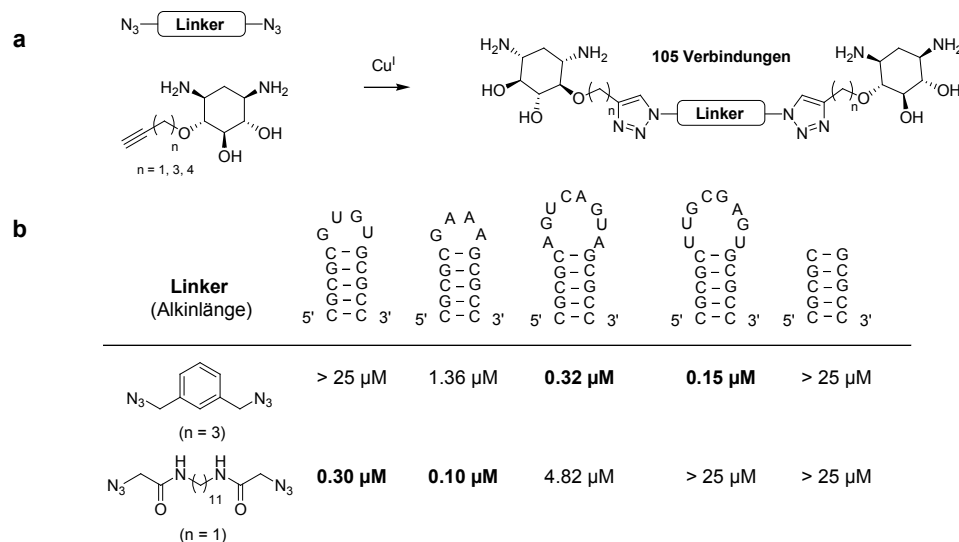


Abb. 2-20 | Vorgeschlagener Mechanismus der Liganden-beschleunigten CuAAC | Es wird angenommen, dass Cu^{I} mit vierzähligen Liganden einen dinuklearen Komplex bildet (CCDC-ID 671781), der in Anwesenheit eines terminalen Alkylins zerfällt. Durch Verdrängung des Lösungsmittels (LM) kann zusätzlich ein Azid an das Kupferzentrum koordinieren. Diese lokale Aufkonzentrierung der Reaktionsteilnehmer führt zu einer erleichterten Produktbildung.^[103]

Die breite Anwendung der CuAAC ist vor allem darauf zurückzuführen, dass sich sowohl Azide als auch terminale Alkine leicht in organische Moleküle einführen lassen, unter vielen Reaktionsbedingungen inert sind und eine Vielzahl von Funktionalitäten tolerieren. Zudem ist das gebildete 1,4-disubstituierte 1,2,3-Triazol chemisch sehr stabil. Thomas *et al.* setzten die CuAAC zum Aufbau einer kombinatorischen Bibliothek von 2-DOS-Dimeren ein (Abb. 2-21).^[104] Belegt durch *RNase Footprinting*- und Bindungsassays sind einige der so dimerisierten Verbindungen in der Lage sequenzunabhängig zwischen Tetra- und Octa-*Hairpin-Loops* zu differenzieren. Allerdings wurden ausschließlich artifizielle Haarnadelstrukturen untersucht, deren Sequenz überwiegend das präferierte 2-DOS-Bindungsmotiv 5'-GU-3' enthielt. Zudem wurden alle RNAs durch einen Stammbereich aus fünf GC-Basenpaaren ohne konkurrierende interne Schleifen oder Ausbuchtungen abgeschlossen, sodass eine bivalente Bindung nach dem Vorbild von Wang und Tor nicht möglich war.^[95b] Die Bindung an natürlich vorkommenden RNAs, wie z. B. prä-miRNAs wurde nicht untersucht.



25

Abb. 2-21 | Modularisierte Synthese von 2-DOS-Dimeren | **a** Durch Nutzung der CuAAC wurden 105 Dimere mit 2-DOS-Motiv synthetisiert. | **b** Dissoziationskonstanten von zwei ausgewählten Verbindungen mit diversen, artifiziellen RNA-Strukturen.

In Anlehnung der Publikation von Thomas *et al.* wurde im Rahmen der eigenen Diplomarbeit im Arbeitskreis Arenz geprüft, ob sich solche 2-DOS-Dimere prinzipiell für die Inhibition der miRNA-Reifung eignen.^[105] Jedoch erwiesen sich die publizierten Syntheserouten als unzureichend, chiraless 4-O-Alkin-modifiziertes 2-DOS herzustellen: Racemisierung, Umlagerungen, ungeeignete Schutzgruppentechniken sowie unerwünschte intramolekulare Nebenreaktionen erschwerten den Zugang zu den benötigten Alkin-Grundbausteinen. Auch die Protokolle für die CuAAC sowie für die Reinigung der Endverbindungen erwiesen sich als unzuverlässig, sodass schließlich nur neun, unvollständig charakterisierte 2-DOS-Dimere isoliert und auf ihr inhibitorisches Potential getestet werden konnten. Dabei deutete sich an, dass die miRNA-Reifung durch 2-DOS-Di

mere gehemmt werden kann. Für valide Aussagen hinsichtlich Inhibition und Spezifität bedurfte es aber einer deutlichen Ausweitung der Substanzvielfalt.

Des Weiteren verwendete die Arbeitsgruppe von Disney die CuAAC um Azid-modifiziertes Kanamycin A an zwei-, drei- oder vierfach alkinylierte Peptide zu konjugieren.^[106] Vorarbeiten hatten gezeigt, dass Kanamycin A bei der Bindung interner Schleifen das 5'-CUG-3' Motiv favorisiert.^[107] Im Morbus Muskeldystrophie vom Typ DM1 wird eben dieses Triplet infolge eines genetischen Defekts in der 3'-UTR der mRNA einer Proteinkinase abnorm häufig aneinandergereiht und faltet in eine markante Haarnadelstruktur (Abb. 2-22a). Diese wiederum wird vom RNA-Spleißregulator *MBNL1* (*Muscleblind-like 1 Protein*) adressiert, der dadurch seine reguläre Funktion nicht mehr ausüben kann. Die multivalent präsentierten Kanamycin-A-Verbindungen konnten an einer Modell-RNA mit *MBNL1* um die Bindung konkurrieren und übertrafen dabei den IC₅₀-Wert von unkonjugiertem Kanamycin A um einen Faktor von bis zu 3800. Diese Beobachtung illustriert, dass RNA-Binder bezüglich der Affinität von einem simultanen Kontaktieren multipler Sekundärstrukturelemente profitieren können. Tetramere von Kanamycin A, die über einen sehr flexiblen Linker auf Ethylenglykolbasis an das Peptoidrückgrat geknüpft waren (Abb. 2-23b) wiesen einen IC₅₀-Wert bis in den unteren nM Konzentrationsbereich auf. Die ermittelten IC₅₀-Werte hingen generell von den Abständen der Kanamycin-A-Einheiten sowie der Flexibilität des Peptoidrückgrats ab. Beide Parameter konnten über Einschübe im Peptoid definiert eingestellt werden (Variable y in Abb. 2-22c). Kürzte man zudem die Verbindung zwischen Rückgrat und Aminoglykosid um zwei Drittel war der Trend zu höheren IC₅₀-Werten zu beobachten (Variable z). Obgleich diese Ziel-RNA durch repetitive Sequenzen sehr simpel ist, demonstriert dieses Beispiel die Bedeutsamkeit von Rigidität und Abstand multivalent verknüpfter *Loop*-Binder und leistet einen wichtigen Beitrag für das bessere Verständnis der Grundlagen zur RNA-Erkennung. Daneben könnten diese Publikationen auch für die Optimierung niedermolekularer prä-miRNA-Binder auf Aminoglykosidbasis nützlich sein.

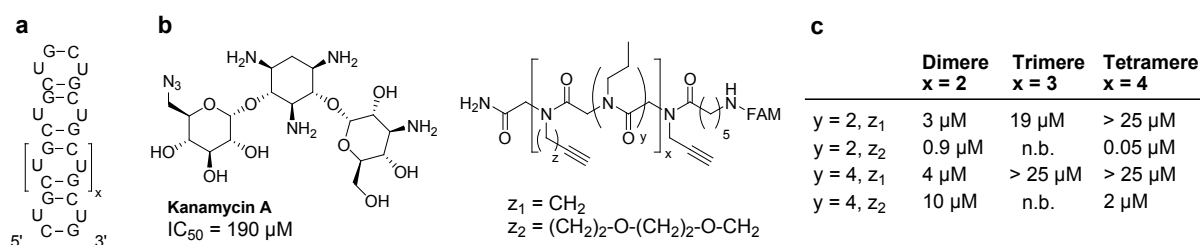


Abb. 2-22 | Modularisierte Synthese von multivalent verknüpftem Kanamycin A | **a** Das repetitive 5'-CUG-3'-Triplet faltet in eine Sekundärstruktur, die vom Spleißregulator *MBNL1* gebunden wird und ihn so in der Ausübung seiner Funktion inhibiert. | **b** Module für den Aufbau einer kleinen Bibliothek potentieller Inhibitoren der *MBNL*-Bindung mittels CuAAC, x variiert die Anzahl von Kanamycin A-Einheiten, y die Flexibilität des Peptoidrückgrats und z den Abstand des Kanamycins A vom Peptoidrückgrat, FAM diente der Visualisierung im Inhibitionsassay | **c** IC₅₀-Werte, gemessen an einer Modell-DM1-RNA mit 12-fachem CUG-Schleifenmotiv ohne konkurrierende RNAs.

2-8 | Detektion der miRNA-Reifung

Im Arbeitskreis Arenz wurden zwei Assays zum Screening potentieller Inhibitoren der miRNA-Reifung entwickelt. Angelehnt an das Funktionsprinzip der *molecular beacons* stellten Davies *et al.* einen homogenen Fluoreszenzbasierten Assay vor.^[63b, 108] In diesem wurden sowohl 3'- als auch 5'-Ende der zu untersuchenden prä-miRNA mit einem Fluoreszenzlöcher und einem Fluorophor markiert (Abb. 2-23).^[109] Bleibt die Haarnadelstruktur infolge eines potenten Inhibitors oder durch denaturiertes *Dicer* intakt, wird die Fluoreszenz durch Kontakt-*Quenching* gelöscht. Erst eine Spaltung durch natives *Dicer* ermöglicht eine räumliche Trennung vom Fluoreszenzlöcher und dem Fluorophor und resultiert in einem Anstieg der Fluoreszenzintensität. Die Schwäche dieses Assays liegt vor allem in der Modifikation der 3'- und 5'-Enden der prä-miRNA-Sonde. Zum einen reagiert das „molekulare Lineal“ von *Dicer* empfindlich auf Veränderungen an beiden Enden.^[9b] Zum anderen ist es nicht auszuschließen, dass die Modifikationen selbst eine Affinität zum potentiellen Inhibitor vermitteln, die es in der nativen prä-miRNA nicht gibt.

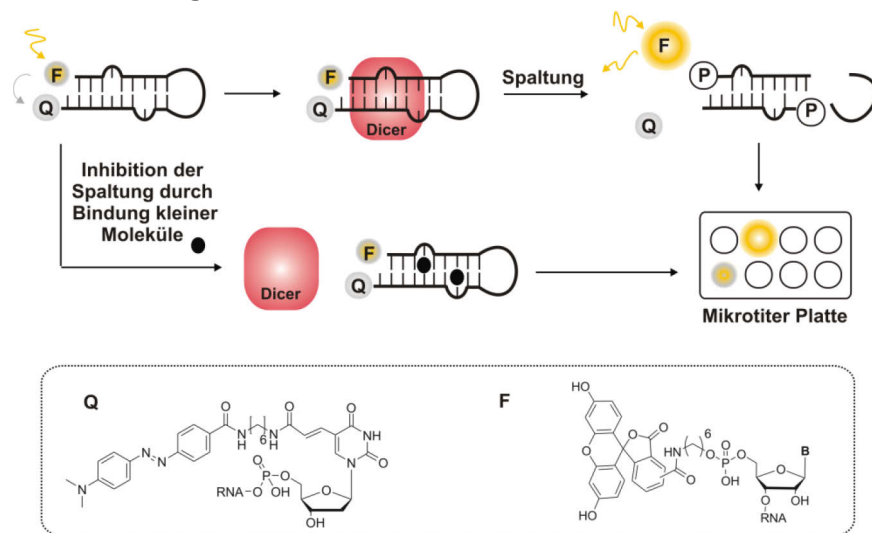


Abb. 2-23 | Fluoreszenzbasierter Assay der miRNA-Reifung

Die Bemühungen die Probleme des Fluoreszenzbasierten Assays zu umgehen, mündeten schließlich in einem Reifungsassay, der völlig ohne Derivatisierungen in der prä-miRNA auskommt (Abb. 2-24).^[110] Dazu werden Testsubstanz, prä-miRNA und *Dicer* zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Erst im Anschluss daran wird die Menge an gebildeter miRNA durch eine isothermale *Rolling Circle Amplification* (RCA) in Gegenwart des Nukleinsäure-detektierenden Fluorophors *SYBR® Gold* ausgelesen. Im Gegensatz zu dem Fluoreszenzbasierten Assay wird nicht allgemein die Prozessierung durch *Dicer*, sondern sequenzspezifisch die Bildung der reifen miRNA detektiert. Als Primer der RCA fungiert ausschließlich die vom 5'-Ende der prä-miRNA stammende reife miRNA, die sequenzspezifisch an ein zirkuläres DNA-Templat bindet und damit die Amplifizierung durch die DNA-Polymerase *Bst* einleitet. Weder unprozessierte prä-miRNA noch die reife miRNA vom 3'-Ende führen zu einer Amplifizierung des DNA-Templats. Letzteres

enthält zusätzlich eine Sekundärprimer-Sequenz, die der Signalverstärkung dient (*Branched Rolling Circle Amplification*, BRCA). Der BRCA-Reifungsassay kann auch genutzt werden, um Selektivitäten einer Testsubstanz hinsichtlich einer Inhibition der miRNA-Reifung zu ermitteln. Dafür werden im Reifungsschritt zwei prä-miRNAs A und B mit einem potentiellen Inhibitor vorgelegt und bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird dieser Reifungsansatz aufgeteilt, jeweils mit dem zirkulären DNA-Templat A oder B versetzt und der Fluoreszenzanstieg bestimmt. Tendiert eine Testsubstanz zur Inhibition der miR-A-Reifung, fällt der Fluoreszenzanstieg im Vergleich zum Reifungsansatz B kleiner aus. Werden beide gleich stark inhibiert, ist auch der Fluoreszenzanstieg ähnlich.

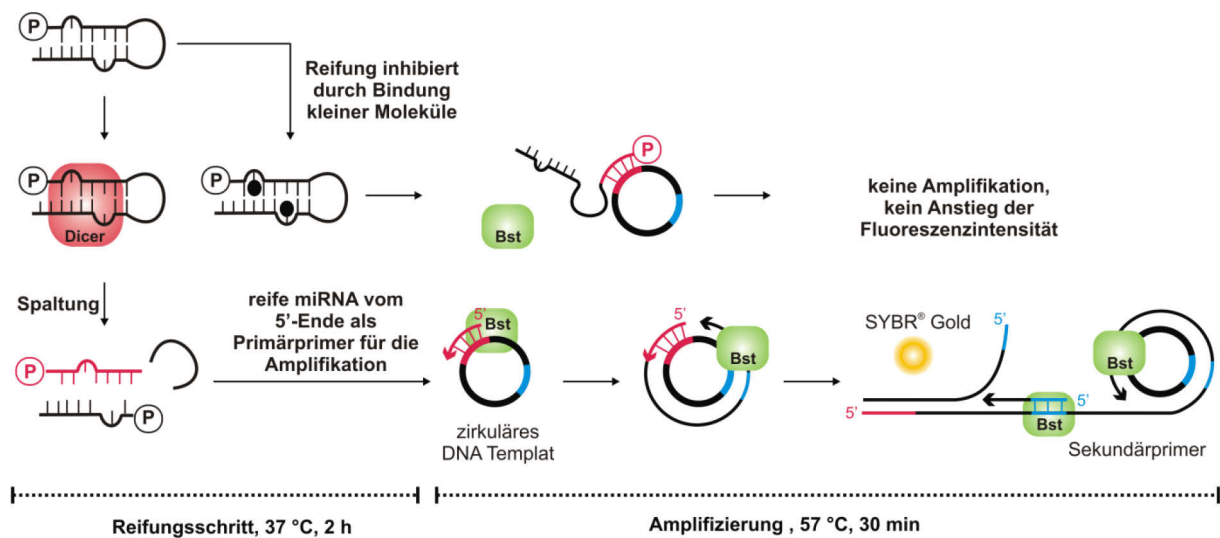


Abb. 2-24 | BRCA-basierter Assay der miRNA-Reifung

Durch den Verzicht terminaler Fluorophore sowie Fluoreszenzlöcher ist der BRCA-Assay dem Fluoreszenzbasierten-Assay bei der Suche nach potentiellen Inhibitoren der miRNA-Reifung konzeptionell überlegen. Fluoreszierende RNA-Modifizierungen können aber z. B. für die Bildgebung und Detektion der miRNA-Reifung innerhalb der Zelle von Interesse sein. Darüber hinaus können auch nicht-fluoreszierende Modifizierungen nützlich sein, z. B. wenn prä-miRNAs für Bindungsstudien an Oberflächen immobilisiert werden sollen.

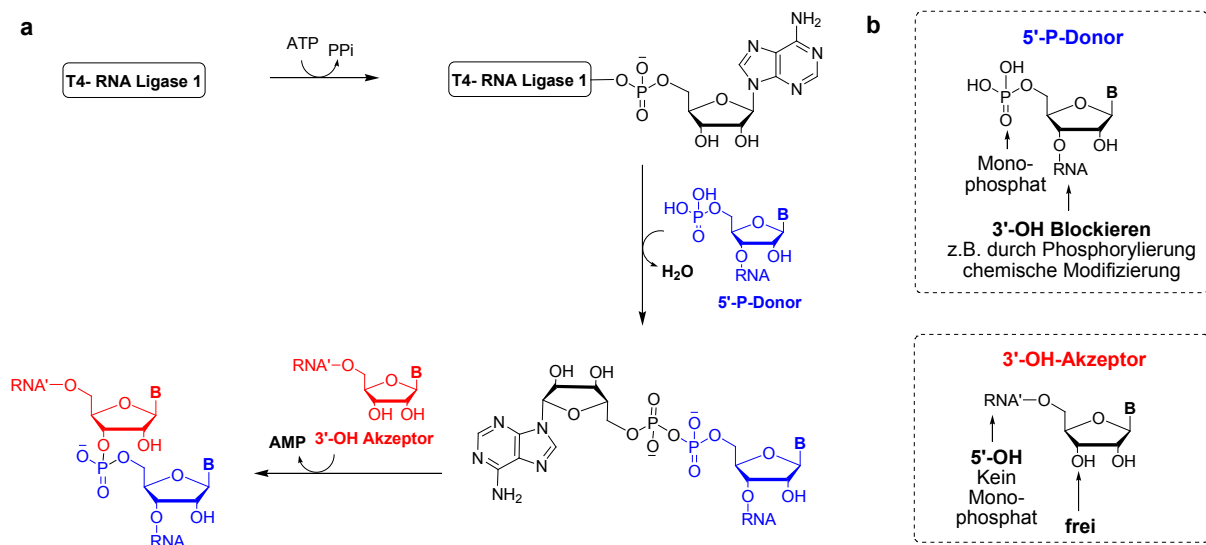
2-9 | Chemo-enzymatische, ortsspezifische Modifizierung von RNA

2-9.1 | Synthese von RNA

Für die RNA-Synthese wird überwiegend die automatisierte Festphasensynthese auf Basis von Phosphoramiditen und der Schutzgruppe 2'-O-[(Triisopropylsilyl)oxy]methyl (TOM) genutzt.^[111] Faktoren wie Kupplungsausbeuten sowie -dauer und die anspruchsvolle Reinigung der abgespaltenen RNAs stellen jedoch Limitationsfaktoren für die Sequenzlänge der synthetisierten RNAs dar; in der Literatur wird ein Wert von ca. 50 nt angegeben.^[112] Da biologisch relevante RNAs, darunter auch prä-miRNAs, meist

bedeutend länger sind, wird häufig auf enzymatische Methoden ausgewichen. Zum einen können durch Festphasensynthese synthetisierte kurze RNA-Stränge mithilfe von Ligasen verknüpft werden oder es wird auf *in-vitro*-Transkription eines DNA-Templats mithilfe von RNA-Polymerasen und Ribonukleosidtriphosphaten (rNTPs) zurückgegriffen.^[113]

Die *T4 RNA Ligase 1* katalysiert Templat-unabhängig die Ligation einzelsträngiger 5'-Phosphat-Nukleinsäureendonoren an 3'-Hydroxyl-Nukleinsäureakzeptoren (Abb. 2-25). Dazu wird im ersten Schritt unter ATP-Verbrauch ein kovalenter AMP-Enzym-Komplex gebildet und der Adenosylrest anschließend auf den 5'-Phosphat-Donor übertragen. Das entstehende Pyrophosphat ist hochreaktiv und wird durch Angriff des 3'-Hydroxyl-Akzeptors unter Bildung von AMP und einer 3'→5'-Phosphodiester-Bindung gespalten. Aus diesem Mechanismus ergeben sich präzise Anforderungen an das Design der zu ligierenden Edukte: Der Donor muss 5'-*O*-monophosphoryliert sein und das 3'-Ende muss an der 3'-Hydroxylfunktion so modifiziert werden, dass es nicht erneut ligiert werden kann. Um eine intramolekulare Ligation des 3'-OH-Akzeptors zu verhindern, darf dessen 5'-Ende nicht 5'-*O*-monophosphoryliert sein. Darüber hinaus ist der Einsatz von Oligonukleotiden als Donor nicht zwingend. Ein Verkürzen bis hin zum Dinukleosidiphosphat oder dem Mononukleosid-3',5'-*O*,*O*-bisphosphat ist ebenso möglich.^[114]



29

Abb. 2-25 | Vorgeschlagener Mechanismus der *T4 RNA Ligase 1* | a Templat-unabhängig wird unter ATP-Verbrauch eine neue 3'→5' Phosphodiester-Bindung geknüpft | **b** Aus dem Mechanismus abgeleitete Strukturanforderungen an die zu ligierenden (Oligo)Nukleotide.

Bei der *in-vitro*-Transkription wird in einer zellfreien Umgebung die Sequenzinformation eines DNA-Templats durch RNA-Polymerasen auf RNA übertragen (Abb. 2-26). Dafür werden wiederholt Ribonukleosidtriphosphate, getrieben durch den Energiegewinn bei der Hydrolyse von Phosphorsäureanhydriden, in 5'→3'-Richtung aneinandergefügt. Das Templat wird dabei in 3'→5' Richtung transkribiert und muss neben der komple-

mentären, inversen RNA-Sequenz, auch einen doppelsträngigen Promotor enthalten, an dem die Polymerasen hochspezifisch binden und dadurch die Transkription initiieren. Der Großteil kommerziell verfügbarer Transkriptions-Kits enthält *T7*-RNA-Polymerasen mit Klasse-III-Promotoren, die eine markante Präferenz für Guanotin an der ersten Nukleotidposition des RNA-Transkripts ausweisen. Befinden sich dort z. B. Cytidin oder Adenosin, sinken die Transkriptionsausbeuten im Vergleich zu Guanotin auf 10 bzw. 20 %.^[113a, 115] Um die Transkription zu stoppen werden *DNasen* dem Transkriptionsansatz zugefügt, die das DNA-Templat hydrolysieren.



Abb. 2-26 | Schematische Darstellung der *in-vitro*-Transkription | Das DNA-Templat sowie der Promotor sind in schwarz und das generierte RNA-Transkript in rot dargestellt.

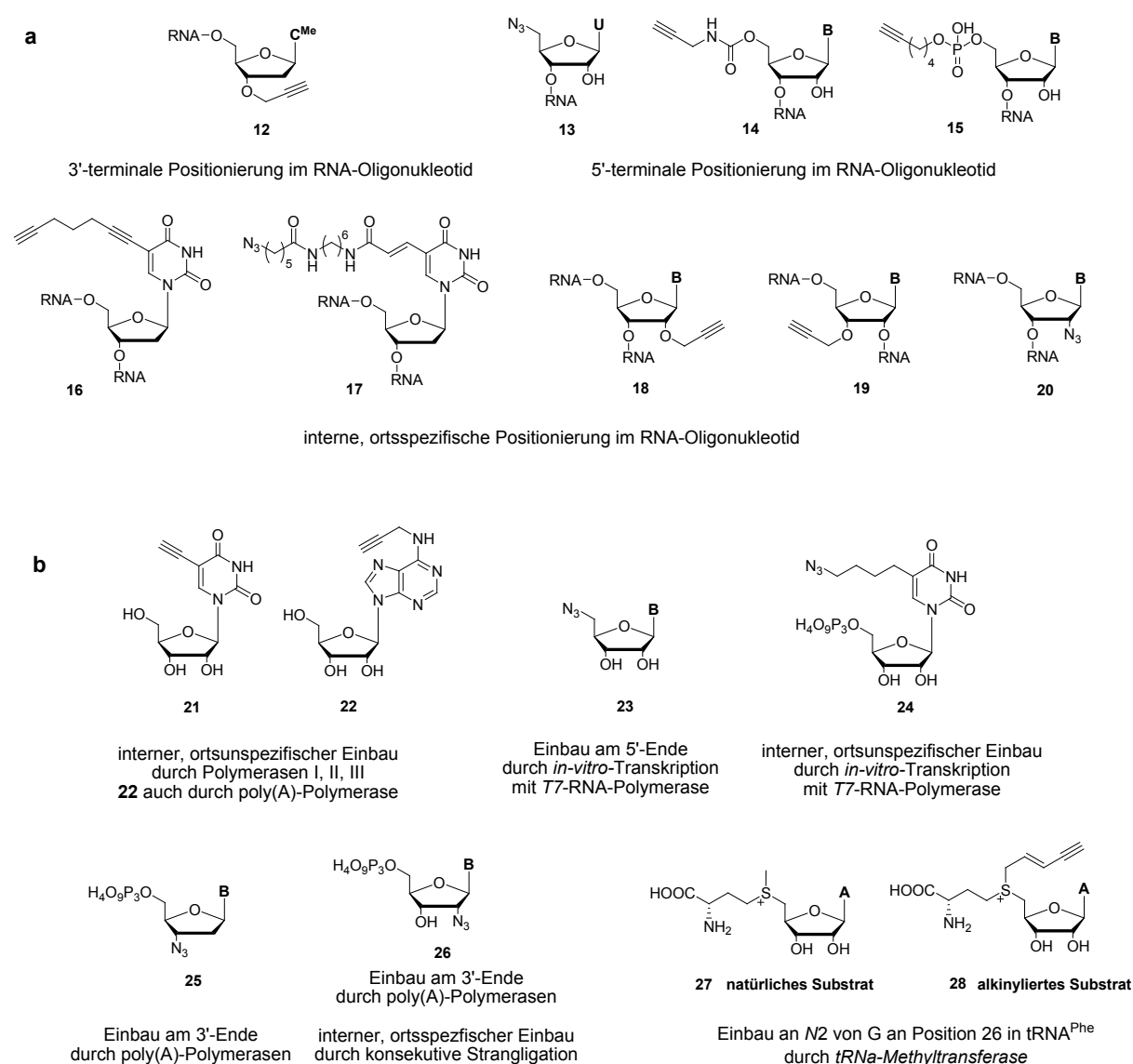
Sowohl in der RNA-Festphasensynthese als auch in der enzymatischen RNA-Synthese können derivatisierte RNA-Bausteine verwendet werden, um RNA z. B. mit Fluorophoren zu markieren. Mitunter werden solche Modifikationen, bedingt durch ihre Größe oder chemische Natur, vom Enzym nicht als Substrat toleriert oder sind mit den Bedingungen der Festphasensynthese nicht kompatibel. In solchen Fällen wird auf die Inkorporation kleiner reaktiver funktioneller Gruppen ausgewichen und die gewünschte Modifizierung erst post-synthetisch über eine selektive chemische Reaktion eingefügt.^[116]

Aufgrund ihrer einfachen Handhabung ist die Kupplung primärer Amine mit NHS-Estern weit verbreitet.^[117] Diese Methode schließt aber die Verwendung von aminhaltigen Puffern wie Tris aus und weist durch schlechte Löslichkeit und Hydrolyseempfindlichkeit des aktivierten Esters in alkalisch-wässrigen Medien häufig schlechte Kupplungseffizienzen auf. Des Weiteren kann das 2',3'-Diol am 3'-Ende einer RNA genutzt werden, um durch eine Kombination aus Glykospaltung und reduktiver Aminierung die gewünschten Reste einzuführen.^[118] Die CuAAC ist eine weitere Möglichkeit um RNA post-synthetisch zu modifizieren.

2-9.2 | CuAAC als post-synthetische Modifizierungsstrategie von RNA

Die CuAAC ist prinzipiell für post-synthetische Modifizierungen in RNA geeignet: Sowohl Azide als auch Alkine sind abiotisch, reagieren miteinander chemoselektiv und sind zudem kompatibel mit wässrigen Medien. Jedoch wurden bislang nur sehr wenige Beispiele für die Anwendung von CuAAC auf RNA publiziert. Dies ist vor allem darauf zurückzuführen, dass RNA, im Gegensatz zu DNA, Kupfer-vermittelten Strangbrüchen gegenüber besonders empfindlich ist.^[119] Erst der Befund, dass Kupfer-stabilisierende Liganden wie TBTA oder THPTA diesen unerwünschten Effekt wirksam unterdrücken können, hat insbesondere in den letzten zwei Jahren zu einem Anstieg publizierter Beispiele geführt (Abb. 2-27).^[101a, 120]

Mit der Festphasensynthese können Alkine ortsspezifisch in den anwachsenden RNA-Strang integriert werden. Azide sind mit den üblichen Bedingungen der Festphasensynthese jedoch nicht kompatibel. Aus diesem Grund werden sie entweder erst nach Abschluss der Synthese eingeführt (**13**) oder die Reaktionsbedingungen werden so variiert, dass das Azid nicht mit den P^{III}-Spezies durch Staudinger Reaktion abreagieren kann.^[121] In den Experimenten von Brown und El-Sagheer wurden **12**, **13**, **16** sowie **17** an der festen Phase aufgebaut und anschließend durch CuAAC inter- bzw. intramolekular zu einem funktionsfähigen *Hammerhead* Ribozym vernetzt.^[120, 122] Yamada *et al.* nutzten ebenfalls die Festphasensynthese um Azid-tragende Kohlenhydrate, Cholesterole, lipophile Alkylketten oder Oligoamine an siRNAs zu konjugieren (mit **14**, **18** oder **19**).^[123]



31

Abb. 2-27 | CuAAC als post-synthetische Modifizierungsstrategie in RNA | a Beispiele für post-synthetisch modifizierbare RNA-Oligonukleotide, synthetisiert durch Festphasensynthese. | **b** Beispiele für post-synthetisch modifizierbare RNA- und DNA-Bausteine, integrierbar durch enzymatische Methoden.

Für enzymatischen RNA-Synthesemethoden können sowohl Alkin- als auch Azid-modifizierte Moleküle verwendet werden, jedoch gibt es bisher nur wenige Möglichkeiten diese an einer definierten Position im RNA-Strang zu platzieren. Beispiele für einen ortsunspezifischen Einbau stammen von Jao *et al.* und Grammel *et al.*, die durch Verwendung der alkinylierten Nukleoside **21** bzw. **22** und Azid-modifizierte Fluorophore Orte der zellulären Transkription visualisieren konnten. Dazu wurden die Nukleoside in Zellen transfiziert, wo sie zunächst enzymatisch in Triphosphate überführt und anschließend in die elongierten RNA-Transkripte eingebaut wurden.^[124] Für die enzymatische Implementierung per *in-vitro*-Transkription wurden z. B. die Triphosphate **24** oder **26** verwendet.^[125]

Die 5'- und 3'-Enden von RNA sind Positionen, an denen Azide oder Alkine auf enzymatischem Weg ortsspezifisch integriert werden können, z. B. wurde für die Adressierung des 5'-Endes durch *in-vitro*-Transkription der Transkriptionsstarter **23** eingesetzt. Da er an der 5'-Position kein Triphosphat besitzt, sondern eine Azidogruppe, kann er ausschließlich an der ersten Nukleotidposition des Transkripts inkorporiert werden. Das 3'-Ende von RNAs konnte durch poly(A)-Polymerase mit **25** oder **26** verlängert werden.^[124b, 126] Auch die Ligation eines Azid- oder Alkin-funktionalisierten Nukleotids mithilfe der *T4 RNA Ligase 1* ist theoretisch an diesem Ende möglich, wurde bislang aber nicht beschrieben.

32

Der gezielte Einbau von Aziden oder Alkinen an einer definierten Stelle innerhalb enzymatisch erzeugter RNA stellt eine weitaus größere Herausforderung dar. In diesem Zusammenhang stellten Winz *et al.* kürzlich eine Methode vor, bei der ein Azid-funktionalisierter Baustein an das 3'-Ende einer RNA eingefügt wurde und durch anschließende Ligation eines RNA-Oligonukleotids an eine interne Position rückte.^[125b] Zudem ist es möglich Methyltransferasen einzusetzen, deren natürliches Substrat S-Adenosyl-L-methionin **27** auch als Alkin-Überträger (**28**) fungieren kann. Der Alkin-modifizierte Baustein kann allerdings ausschließlich auf das N2 des Guanosins an Position 26 der tRNA^{Phe} transferiert werden.^[127]

3 | Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese und das Screening von potentiellen Inhibitoren der miRNA-Reifung. Im Hinblick darauf sollten Aminoglykosidderivate hergestellt werden, um zu prüfen, ob diese durch eine Bindung an miRNA-Vorläufer den *Dicer*-vermittelten Reifungsschritt hemmen können (Abb. 3-1). Solche prä-miRNAs bilden typischerweise mehrere Schleifen und Ausbuchtungen aus, deren Sequenz, Größe und relative Abstände zueinander jede prä-miRNA eindeutig identifizieren und die für eine Bindung von Substanzen auf Aminoglykosidbasis prinzipiell geeignet sind.^[72] Ein rationales Design solcher Verbindungen war jedoch aufgrund der bislang nur unpräzise vorhersagbaren dreidimensionalen prä-miRNA-Strukturen und mangels detaillierter Kenntnisse über die Wechselwirkungen zwischen prä-miRNAs und Aminoglykosiden nicht möglich. Daher wurde der kombinatorische Aufbau einer strukturell diversen Substanzbibliothek angestrebt.

33

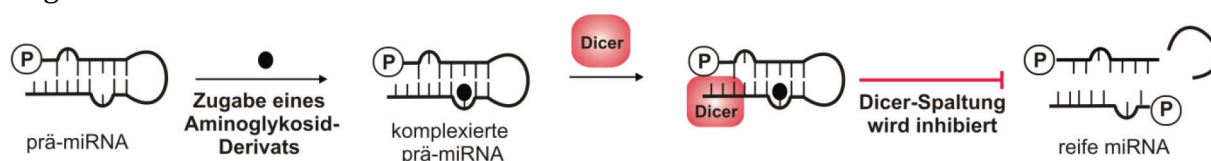


Abb. 3-1 | Inhibition der miRNA-Reifung durch Aminoglykosid-Derivate

Für den modularen Aufbau einer Bibliothek potentieller prä-miRNA-Binder sollten die bekannten RNA-Binder 2-Desoxystreptamin sowie Neamin mit Propargyl- bzw. Pentynylresten regio- sowie enantioselektiv funktionalisiert und durch die Kupfer-katalysierte Azid-Alkin 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC) mit verschiedenen bivalenten Aziden kombiniert werden (Abb. 3-2a).^[100] Bezüglich der Einführung der Alkin-Funktionen sowie dem Protokoll zur Alkin-Bisazid-Verknüpfung hatten erste eigene Vorarbeiten am 2-Desoxystreptamin den Bedarf einer gründlichen Methodenoptimierung aufgezeigt.^[87a, 104-105] Da der Umfang der Substanzbibliothek entscheidend von der Zugänglichkeit der Grundbausteine sowie der Effizienz ihrer Verknüpfung abhängt, bildeten die Etablierung

einer neuen Boc- und Cyclohexylidenbasierten Schutzgruppenstrategie für die Synthese der Alkinbausteine ebenso wie die Optimierung der Reaktionsbedingungen für die CuAAC einen wichtigen Schwerpunkt dieser Arbeit (Abb. 3-2a).

Die Dimerisierung von 2-Desoxystreptamin- bzw. Neamin-Einheiten zielte zum einen darauf ab, durch das simultane Kontaktieren zweier Bindungsstellen innerhalb einer prä-miRNA die Bindungsaffinität zu steigern. Zum anderen sollte untersucht werden, ob sich durch die bivalente Präsentation eines Aminoglykosids in einem Abstand, der dem zweier Sekundärstrukturmodule einer Ziel-prä-miRNA entspricht, die miRNA-Reifung selektiv inhibieren lässt (Abb. 3-2b). Deshalb sollte ein möglichst breites Spektrum an kurzen, langen, hydrophoben, hydrophilen, starren, flexiblen, aliphatischen bzw. aromatischen Bisazidlinkern synthetisiert werden. Um etwaige Präferenzen eines Inhibitors zu ermitteln, sollten alle Substanzen abschließend in einem bereits etablierten *in-vitro*-Reifungsassay in Gegenwart von zwei konkurrierenden prä-miRNAs auf ihr inhibitorisches Potential getestet werden.^[110]

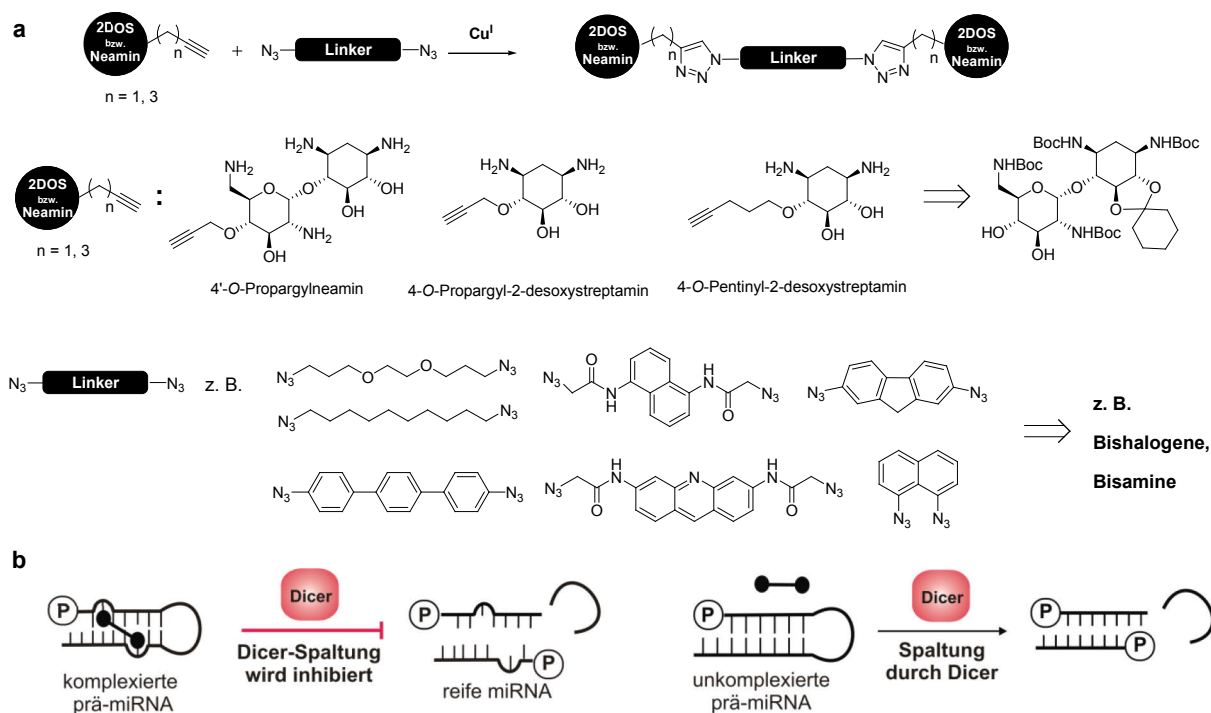


Abb. 3-2 | Gezielte Bindung von prä-miRNAs durch dimerisierte Aminoglykoside | **a** Schematische Darstellung zum Aufbau der Substanzbibliothek durch Verwendung der CuAAC. | **b** Schematische Darstellung zur selektiven Inhibierung der miRNA-Reifung durch gezielte Adressierung eines charakteristischen Sekundärstrukturmodells in der prä-miRNA.

Das zweite Ziel dieser Arbeit war die Synthese Alkin-modifizierter Ribonukleotide, die durch CuAAC mit Azid-funktionalisierten Molekülen konjugiert und dann durch enzymatische RNA-Synthesemethoden gezielt an das 3'- bzw. 5'-Ende von prä-miRNAs eingeführt werden können. Derartig modifizierte prä-miRNAs könnten u. a. für die Detektion der miRNA-Reifung *in cellulo* nützlich sein.

Um das 5'-Ende der prä-miRNAs zu modifizieren, sollte ein Transkriptionsstarter synthetisiert werden, der durch *in-vitro*-Transkription eines DNA-Templats mittels *T7*-RNA-Polymerase eingeführt werden kann. Die Konzeption eines solchen Initiators musste daher berücksichtigen, dass *T7* Guanosin als Startnukleotid favorisiert. Darüber hinaus musste sichergestellt sein, dass das modifizierte Nukleotid nicht an beliebiger Stelle im 5'→3'-synthetisierten RNA-Transkript eingebaut wird, sondern ausschließlich am 5'-Ende.^[115] Unter Berücksichtigung dieser Punkte sollte mithilfe der Phosphoramiditchemie eine Synthese für *O*-(5'-Guanosin)-*O*-propargylmonophosphat etabliert werden (Abb. 3-3).

Für die enzymatische Inkorporierung eines modifizierten Nukleotids am 3'-Ende von prä-miRNAs sollte die *T4 RNA Ligase 1* zum Einsatz kommen. Um zu verhindern, dass die prä-miRNA unkontrolliert verlängert wird, musste ein geeigneter Ligationsbaustein sowohl an 3'- als auch 5'-*O*-Position phosphoryliert sein. Dies ließe sich entweder durch Umsetzung mit Pyrophosphorylchlorid oder durch Verwendung entsprechender Phosphoramidite realisieren.^[114a] Da die *T4 RNA Ligase 1* Cytidin als Substrat bevorzugt, sollte versucht werden, ein Cytidinbisphosphat zu synthetisieren, dessen exocyclische Aminofunktion durch Transaminierung mit einer Propargylgruppe funktionalisiert ist.

Im Anschluss sollte das propargylierte Guanosinmonophosphat durch CuAAC mit einem Azid-derivatisierten Fluoreszenzlöcher (z. B. Dabcyl) modifiziert und durch *in-vitro*-Transkription an die 5'-Enden verschiedener prä-miRNAs eingeführt werden. Die 3'-Enden sollten durch Ligation eines Fluorophor-derivatisierten Bisphosphats (z. B. mit Alexa Fluor® 633, 5/6-Carboxyfluorescein) verlängert werden. (Abb. 3-3, unten). Dieses Konzept zur Funktionalisierung von prä-miRNAs setzte eine entsprechende Substrattoleranz der Enzyme voraus. Da die Protokolle für solche enzymatischen Methoden jedoch überwiegend auf den Einbau unmodifizierter Nukleotide ausgerichtet sind, mussten sie für das hier angestrebte Vorhaben zunächst adaptiert und optimiert werden.

35

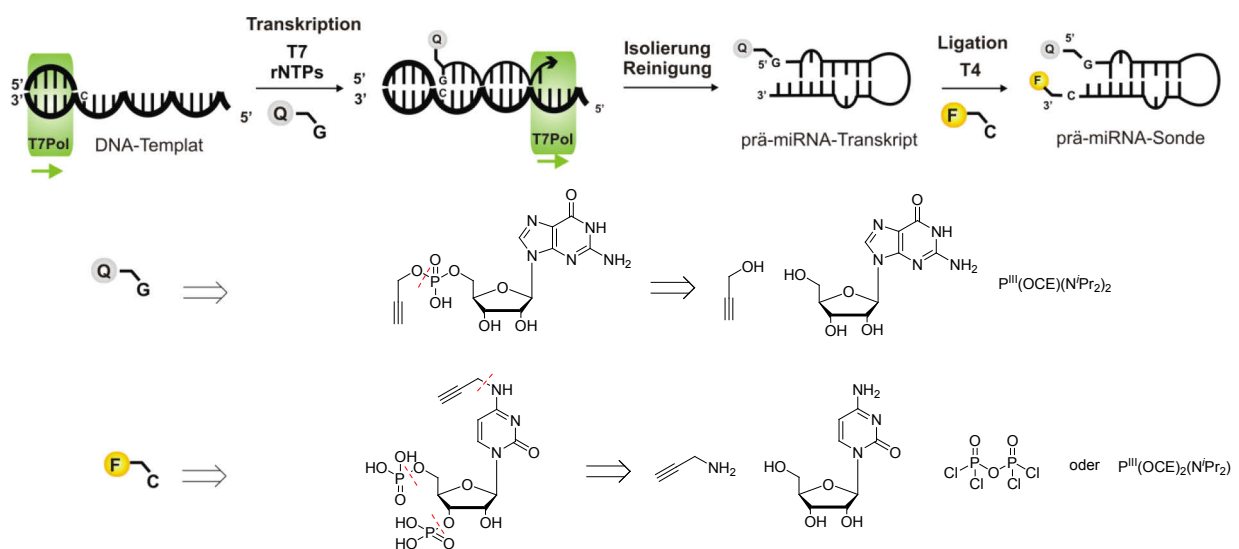


Abb. 3-3 | Konzept zur Synthese modifizierter prä-miRNAs mittels CuAAC und Alkin-modifizierten Ribonukleotiden

4 | Ergebnisse und Diskussion

4-1 | Synthese potentieller Inhibitoren der miRNA-Reifung

Aufgrund des mehrfach belegten kausalen Zusammenhangs zwischen aberranten miRNA-Expressionsmustern und Krankheiten, werden miRNAs verstärkt als Zielmoleküle in der Wirkstoffforschung diskutiert. Wird eine Krankheit durch einen erhöhten miRNA-Spiegel verursacht, könnte die Inhibierung des finalen Reifungsschrittes ein vielversprechender therapeutischer Ansatzpunkt sein. Das Ziel dieses Projekts war daher die Synthese und das Screening von niedermolekularen Verbindungen, welche die miRNA-Reifung inhibieren. Ein möglicher Ansatzpunkt um dies zu realisieren, könnte die Bindung von Substanzen an die haarnadelförmigen, miRNA-Vorläufer sein, so dass der *Dicer*-vermittelte Reifungsschritt gehemmt wird. Diese prä-miRNAs weisen als Konsequenz einer partiellen Selbst-Komplementarität, Duplex-Strukturen auf, die durch Schleifen und Ausbuchtungen unterbrochen werden. Von der Annahme ausgehend, dass die Grundlagen der RNA-Erkennung auch auf prä-miRNAs anwendbar sind, sollten 2-DOS sowie Neamin als strukturelle Leitmotive dienen, da sie die minimalen strukturellen Voraussetzungen für eine effektive Interaktion mit RNA-Sekundärstrukturen enthalten. Das Studium der Wechselwirkungen zwischen Aminoglykosiden und bakteriellen bzw. viralen Ziel-RNAs hatte zudem gezeigt, dass das gleichzeitige Kontaktieren solcher unhybridisierten RNA-Regionen hinsichtlich Selektivität und Affinität von Vorteil sein kann (s. Kap. 2-8.4). Um auch bei der Adressierung von prä-miRNAs multivalenten Effekten profitieren zu können, sollte durch Nutzung der CuAAC eine Substanzbibliothek von Aminoglykosid-basierten Dimeren aufgebaut werden. Dafür wurden Alkin-modifizierte 2-DOS- bzw. Neamin-Derivate benötigt, die mit einer Reihe von bivalenten Aziden kombiniert werden sollten.

4-1.1 | Synthese von 4-*O*-Alkynyl-2-DOS

Erste eigene Vorarbeiten am 4-*O*-Propargyl-2-DOS hatten hinsichtlich der Einführung des terminalen Alkins den Bedarf einer umfassenden Methodenoptimierung offenbart.^[105] Bei der von Thomas *et al.* und Greenberg *et al.* vorgeschlagenen Syntheseroute (Abb.4-1) wurde *meso*-2-DOS **29** durch Azidotransfer und Acetylierung in ein Substrat für eine immobilisierte Lipase überführt, die durch selektive 4-*O*-Deacetylierung das enantiomerenreine Zwischenprodukt **31 ent** lieferte.^[87a, 104] Weil die 4-OH-Funktion durch eine Williamson-Ethersynthese funktionalisiert werden sollte, mussten die Schutzgruppen basischen Reaktionsbedingungen gegenüber stabil sein. Daher wurde in einer vierstufigen Reaktionssequenz die 4-Hydroxylfunktion zunächst mit einem *tert*-Butyldimethylsilylrest maskiert und die Acetylschutzgruppe anschließend gegen ein Acetonid substituiert. Die Abspaltung der Silylschutzgruppe ergab die Verbindung **32**, die jedoch nicht mehr optisch aktiv war. Es wurde vermutet, dass dies das Resultat einer 4→6-*O*-Silylwanderung unter den basischen Bedingungen der Deacetylierung war. Darüber hinaus wurde bei der nachfolgenden Williamson-Ethersynthese mit Propargylbromid und NaH stets das unerwünschte Produkt **34 rac** einer intramolekularen 1,3-dipolaren Cycloaddition erhalten.

38

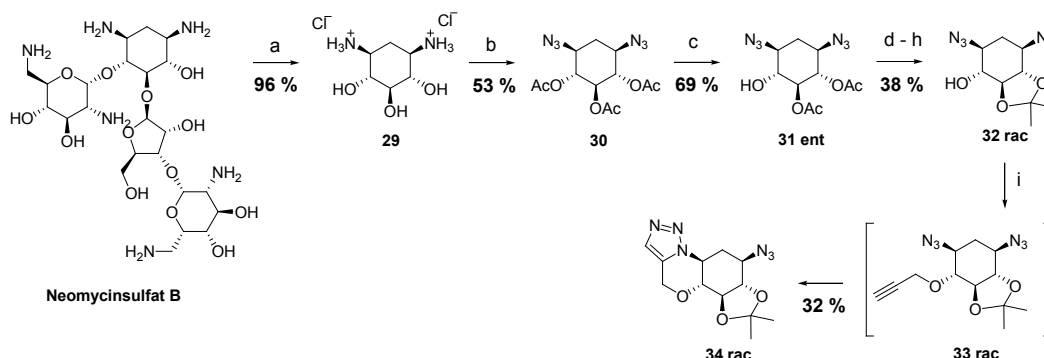


Abb. 4-1 | Synthese von 4-*O*-propargyliertem 2-DOS nach Thomas *et al.* und Greenberg *et al.* | a HCl/MeOH | b TiF_2 , NaN_3 , Cu^{II} | c Ac_2O , DMAP | d Lipase *Candida Antarctica*, pH 6.2 | e TBDMS-Cl, Imidazol | f NaOMe/MeOH | g 1,1-Dimethoxypropan, *p*-TsOH | h TBAF, THF | i Propargylbromid, NaH, TBAI, DMF.

Die geschilderten Probleme bei der Synthese von enantiomerenreinem 4-*O*-Propargyl-modifiziertem 2-DOS führten im Rahmen dieser Arbeit schließlich zur Entwicklung einer alternativen Synthesestrategie. Sie beruht auf den Arbeiten von Canas-Rodriguez *et al.* sowie Tohma *et al.* und nutzt die Chiralität des kommerziell verfügbaren Neomycin B aus (Abb. 4-2).^[128] Die 4-*O*-Position als Derivatisierungsstelle für das terminale Alkin sollte in dieser Syntheseroute erhalten bleiben, da sie auch in den meisten natürlich vorkommenden Aminoglykosiden als Verknüpfungsstelle dient und für RNA-Erkennungsprozesse scheinbar von untergeordneter Bedeutung ist.

Die Synthesesequenz begann mit einer unvollständigen Acidolyse des Neomycin B bis auf die Stufe des Neaminhydrochlorids **35**. Die besten Ausbeuten wurden erzielt, wenn 24 h ohne Unterbrechung refluxiert und danach zügig durch wiederholtes Einengen

sowie Fällen aus EtOH aufgearbeitet wurde. Um eine intramolekulare Azid-Alkin-Cycloaddition prinzipiell auszuschließen, sollte statt der Azidschutzgruppe die leicht einzuführende, säurelabile *tert*-Butyloxycarbonylschutzgruppe (Boc) verwendet werden. Die ebenfalls säurelabile Ketalschutzgruppe zum Schützen des vicinalen 5,6-Diols wurde gewählt, um alle Schutzgruppen am Ende der Synthese in einem Schritt entfernen zu können. Sowohl die Einführung der Boc- als auch der Ketalschutzgruppe gelangen einfach und in guten Ausbeuten mit Boc-Anhydrid in NaOH/1,4-Dioxan bzw. mit 1,1-Dimethoxycyclohexan in Gegenwart von katalytischen Mengen *p*-TsOH. Die 5,6-*O,O*-regioselektive Einführung der Cyclohexylidenschutzgruppe wurde begünstigt durch die höhere thermodynamischen Stabilität von **38** im Vergleich zu **37** bzw. dem entsprechenden 3',4'-*O,O*-substituierten Analogon und wurde durch thermodynamische Äquilibration der zweifach Ketal-geschützten Zwischenstufe **37** in Anwesenheit von MeOH und *p*-TsOH realisiert.^[128a, 128b] Die oxidative Spaltung des 3',4'-Diols zum Bisaldehyd **25** gelang gemäß DC-Kontrolle quantitativ durch Zugabe von NaIO₄ und in MeOH als Lösemittel. Wurde hingegen ein THF/H₂O-Gemisch verwendet, zeigte die DC-Analyse auch nach 24 h keinen vollständigen Eduktumsatz an. Zudem musste der Aldehyd in allen Aufarbeitungsschritten unter bestmöglichem Lichtausschluss sowie bei Temperaturen unterhalb von 30 °C gehandhabt werden.^[129] Die Synthese wurde durch eine zügige Umsetzung von **39** mit 3 Äq. *n*-Butylamin unter Bildung des Diimins und anschließender *E2*-Eliminierung zum Schlüsselintermediat **40** fortgesetzt. Durch den Wechsel des Lösungsmittels sowie durch die Berücksichtigung der licht- und wärmeempfindlichen Eigenschaften des gespaltenen Glykols **39** konnte in diesem Schritt die Ausbeute von 47 % auf 74 % gesteigert werden.

39

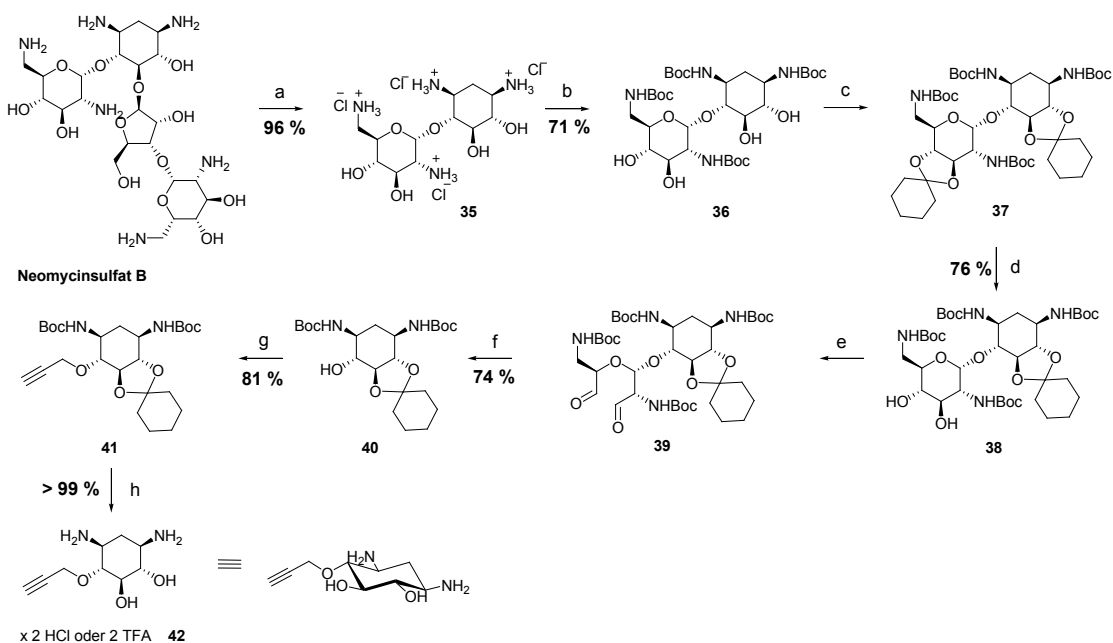


Abb. 4-2 | Synthese von enantiomerenreinem 4-*O*-Propargyl-2-DOS | **a** HCl/MeOH | **b** Boc₂O, NaOH/1,4-Dioxan | **c** 1,1-Dimethoxycyclohexan, *p*-TsOH | **d** MeOH, *p*-TsOH | **e** NaIO₄, MeOH | **f** *n*Bu-NH₂, MeOH | **g** Propargylbromid, NaH, TBAI, THF | **h** TFA/CH₂Cl₂ oder HCl/1,4-Dioxan.

Eine klassische Williamson-Ethersynthese mit NaH, Propargylbromid und katalytischen Mengen Tetrabutylammoniumiodid (TBAI) in THF als Lösungsmittel ermöglichte schließlich die effektive Einführung (81 %) des Propargylrestes an der 4-OH-Position. Eine konkurrierende *N*-Alkylierung wurde durch Kühlung bei der Zugabe von NaH, durch das Vorhandensein der Boc-Schutzgruppe und nur minimale Propargylbromid-Überschüsse wirksam unterdrückt. Die säurelabilen Schutzgruppen konnten mit TFA/CH₂Cl₂ oder aufgrund der zelltoxischen Eigenschaften von TFA vorteilhafter mit HCl in 1,4-Dioxan nahezu quantitativ entfernt werden.^[130] Dieser Syntheseweg eröffnete einen einfachen Zugang zu optisch aktivem 4-*O*-Propargyl-2-DOS ($[\alpha]_D^{22} = +31.5$, *c* 1.0, H₂O) und konnte mit einer Gesamtausbeute von 30 % auch ausreichend Ausgangsmaterial für den Aufbau der Substanzbibliothek bereitstellen.

Das Zwischenprodukt **40** bot sich zugleich für eine Alkin-seitige Abstandserweiterung der 2-DOS-Module an (Abb. 4-3). Die Synthese des pentinylierten 2-DOS **45** wurde bereits von Thomas *et al.* beschrieben und griff auf eine Kombination aus NaH, TBAI, DMF und Pentinylbromid bzw. auf Pentinylmesylat zurück.^[104] Die auf diesem Weg erhaltene Verbindung zeigte aber aufgrund der Reaktionsführung keine optische Aktivität mehr (vgl. Abb. 4-1) und sollte daher mit Hilfe der neu entwickelten Boc-basierten Strategie hergestellt werden. Die Adaption der Reaktionsbedingungen für diesen Syntheseweg gestaltete sich jedoch als unerwartet schwierig. Zum einen konnte DMF nicht als Lösungsmittel verwendet werden, da es unter basischen Bedingungen die Bildung eines intramolekularen Carbamats **43** förderte, in dem die 4-Hydroxyposition nicht mehr alkylierbar ist.^[131] Wurde hingegen THF als Lösungsmittel eingesetzt, war in Gegenwart von NaH, Pentinylmesylat und TBAI in THF auch nach fünf Tagen nur ein geringer Eduktumsatz in der DC-Kontrolle zu beobachten. Bemühungen die Ausbeute der Reaktion zu optimieren, umfassten u. a. eine Temperaturerhöhung auf bis zu 60 °C, ein Wechsel zu Toluol als Solvens und die Variation der Base (KO^{*t*}Bu, Na, CsOH) sowie des Nucleofugs (Iodid, Tosylat, Chlorid mit und ohne *in-situ*-Generierung des Iodids durch Zusatz von TBAI). Erst die zehnfache Erhöhung der Reaktionskonzentration auf 1 M (bezüglich **40**) führte zu einer Steigerung der isolierten Ausbeute. Zusammen mit der Verwendung von THF als Reaktionsmedium und Mesylat als Abgangsgruppe konnte das gewünschte Produkt **44** ($[\alpha]_D^{22} = +4$, *c* 1.0, H₂O) schließlich nach 48 h Rühren bei RT mit einer Ausbeute vom 91 % isoliert werden. Die säurelabilen Schutzgruppen in **44** konnten durch Behandlung mit HCl in 1,4-Dioxan abgespalten werden.

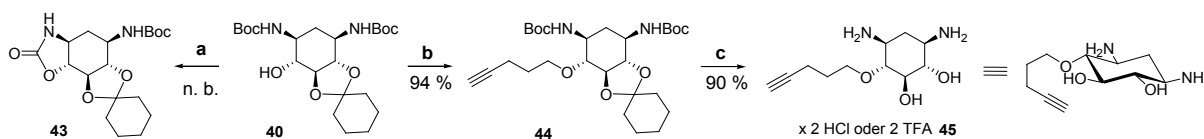
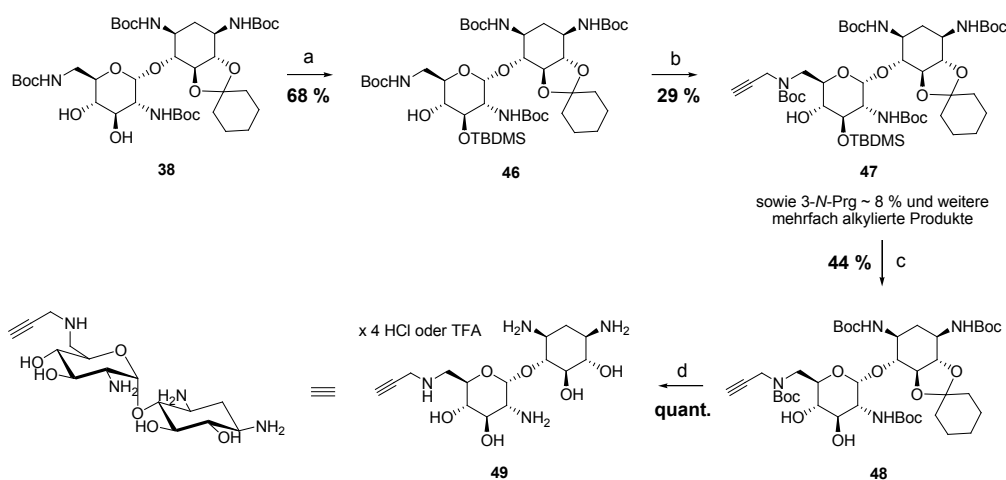


Abb. 4-3 | Synthese des enantiomerenreinen 4-*O*-Pentynyl-2-DOS | a NaH, DMF | b Pentinylmesylat, NaH, TBAI, THF (1 M bezüglich **40) | c TFA/CH₂Cl₂ oder HCl/1,4-Dioxan.**

4-1.2 | Synthese von Propargyl-modifiziertem Neamin

Die Gesamtladung von Aminoglykosiden spielt bei der Adressierung von RNA eine zentrale Rolle, da die Aminofunktionen bei physiologischem pH-Wert protoniert vorliegen und mit dem polyanionischen RNA-Phosphatrückgrat wechselwirken können (vgl. Kap. 2-7.2).^[76, 80] Neben den elektrostatischen Interaktionen werden auch gerichtete Wasserstoffbrückenbindungen mit ungepaarten Nukleobasen ausgebildet. Solche Bindungen wirken nur über kurze Distanzen und können je nach Anzahl und ihrer räumlichen Anordnung eine lokal definierte Ausrichtung des koordinierenden Aminoglykosids ermöglichen, was hinsichtlich der selektiven Erkennung unterschiedlicher RNA-Sekundärstrukturen relevant sein könnte. Daher sollte zusätzlich zu den 2-DOS-Derivaten ein Propargyl-funktionalisiertes Neamin-Analogon hergestellt werden, welches zusätzlich zu dem 2-DOS-Ring ein 6'-Aminoglukosamin enthält. Da die Aminogruppen wichtig für die RNA-Erkennung sind, sollte die Alkinfunktion an einer der vier Hydroxylpositionen eingeführt werden. Da die Verbindung **38** bereits in großen Mengen zur Verfügung stand und zudem Literaturwissen für eine selektive 3'-*O*-Silylierung existierte, sollte die Veretherung mit Propargylbromid an der 4'-Hydroxylfunktion erfolgen.^[132]



41

Abb. 4-4 | Synthese von 6'-N-propargyliertem Neamin | **a** TBDMS-Cl, Imidazol | **b** Propargylbromid, NaH, TBAI, THF | **c** TBAF, THF | **d** TFA/CH₂Cl₂ oder HCl/1,4-Dioxan.

Ausgehend von **38** (Abb. 4-4) gelang die Synthese von **46** mit zufriedenstellender Ausbeute durch Verwendung von TBDMS-Cl in Gegenwart von 1.1 Äq. Imidazol. Der Nachweis einer regioselektiven 3'-*O*-Silylierung war durch die Vielzahl funktioneller Gruppen allerdings schwierig und konnte letztlich durch die im H,H-COSY-NMR-Experiment beobachtete Kopplung zwischen den Protonen der 4'-OH- und 4'-CH-Gruppe erbracht werden (Abb. 4-5a). Die beobachtete Regioselektivität bei der Silylierung ist vermutlich die Konsequenz einer intramolekularen Stabilisierung der 4'-OH-Position durch Wasserstoffbrückenbindungen zum Proton des Carbamats an der 6'-Position (Abb. 4-5b). Ähnlich wurde bei der selektiven Acetylierung in einem Benzyloxycarbonyl-geschützten Neamin-Derivat argumentiert.^[133]

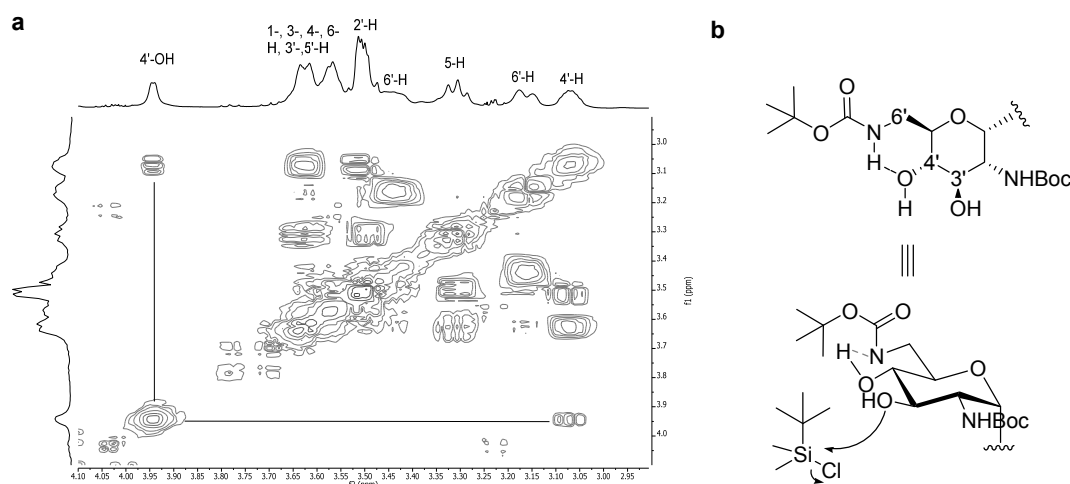


Abb. 4-5 | 3'-O-Selektivität bei der Silylierung von 38 | a Das H,H-COSY-Spektrum von **46**, aufgenommen in CD_3CN , belegte eine Kopplung zwischen 4'-OH und 4'-H. | b Mögliche Erklärung der 3'-O-Selektivität bei der Silylierung von **38** könnte die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung sein, welche die Nukleophilie der 4'-Hydroxyl- im Vergleich zur 3'-Hydroxylfunktion reduziert.

Anschließend sollte die 4'-Hydroxylfunktion mit Propargylbromid und NaH verethert werden. Wie dort sollte eine zu erwartende *N*-Alkylierung durch Kühlung und nur leicht überstöchiometrische Mengen von NaH und Propargylbromid zurückgedrängt werden. Der Reaktionsfortschritt wurde durch DC kontrolliert. Dabei zeigte sich, dass nach 18 h Rühren bei RT das Edukt **45** noch nicht vollständig umgesetzt war. Daneben wurden vier weitere mit Ninhydrin anfärbbare Produkte detektiert, die durch Säulenchromatografie über Kieselgel voneinander getrennt werden konnten. Den massenspektrometrischen Analysen zufolge, handelte es sich bei drei dieser Verbindungen ($R_f > 0.40$) um zweifach alkylierte Produkte. Die vierte Verbindung ($R_f = 0.36$) wies gemäß der ESI-MS-Analyse das korrekte m/z -Verhältnis für ein monoalkyliertes Produkt auf und wurde zusätzlich durch NMR-Spektroskopie charakterisiert. Das ^1H -NMR-Spektrum belegte zwar die Anwesenheit einer Propargylgruppe, jedoch fehlte das Proton der 6'-Carbamatfunktion. Zudem war die Methylengruppe des Propargylrestes im ^{13}C -NMR-Spektrum im Vergleich zum 2-DOS-Derivat **41** stark hochfeldverschoben (39.4 vs. 59.1 ppm). Zusammengefasst deuteten die Beobachtungen darauf hin, dass wider Erwarten nicht die 4'-O-, sondern die 6'-N-Position alkyliert wurde. Eine mögliche Erklärung der ausbleibenden 4'-O-Propargylierung könnte auch hier die Ausbildung einer intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung zwischen der 4'-OH-Gruppe und dem Proton der 6'-NHBoc-Gruppe sein (Abb. 4-6). Eine solche Wechselwirkung wäre mit einer herabgesetzten Nukleophilie der Hydroxylgruppe verbunden, gleichzeitig würde die Elektronendichte am Stickstoff des Carbamats und damit dessen Nukleophilie zunehmen. Darüber hinaus schirmt der sterisch anspruchsvolle 3'-O-Silylrest das favorisierte Reaktionszentrum ab. Die beobachteten Nebenreaktionen unter Bildung mehrfach alkylierter Produkte sowie die Tatsache, dass der Stickstoff im Carbamat durch den *tert*-Butyloxycarbonylrest abgeschirmt wird, sind mögliche Erklärungen für die geringe Ausbeute von 29 % bei der 6'-N-Alkylierung von **46**.

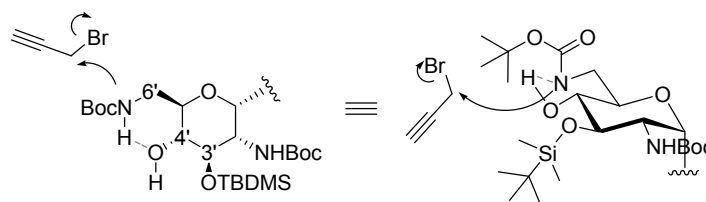
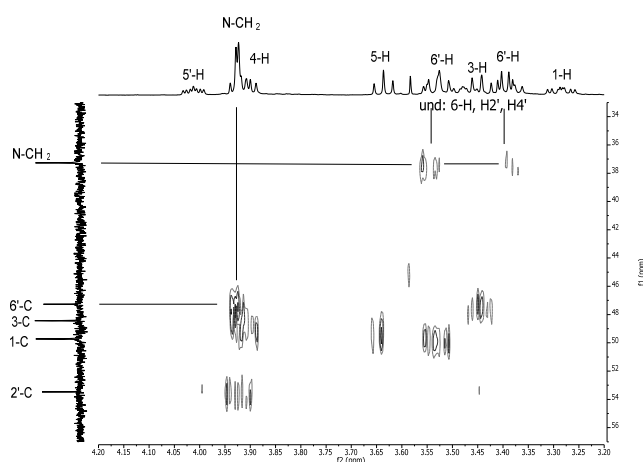


Abb. 4-6 | 6'-N-Selektivität bei der Propargylierung von 46 | Die ausbleibende 4'-O-Propargylierung basiert wahrscheinlich auf sterischen Aspekten sowie einer intramolekularen Stabilisierung durch Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung.

Eine anschließende Abspaltung der Silylgruppe mit TBAF als Fluoridionen-Quelle sowie die Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen durch Behandlung mit 1:4 verdünnter TFA/CH₂Cl₂-Lösung oder wahlweise mit 2 M HCl/1,4-Dioxan-Lösung bei 0 °C lieferte 6'-N-Propargylneamin **49**. Die NMR-Analyse von **49** mit einem HMQC-Experiment erbrachte den Nachweis für die unerwünschte 6'-N-Propargylierung anhand von C,H-Kopplungen zwischen den Methylengruppen des Propargylrestes und der 6'-Methylengruppe (Abb. 4-7). Da Aminofunktionen wichtig für die Erkennung von RNA-Sekundärstrukturen sind, war es wünschenswert die Aminofunktionen sterisch nicht zu überfrachten, damit die dimerisierten Neaminverbindungen ungehindert mit prä-miRNAs wechselwirken können. Daher wurde nach Lösungsansätzen gesucht, um das ursprünglich anvisierte 4'-O-alkylierte Neamin zu isolieren.



C,H-Kopplungen

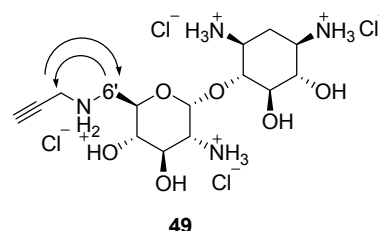


Abb. 4-7 | HMQC-NMR-Spektrum von 49

Durch Anwendung der CsOH-Methode nach Jung, konnten in der Vergangenheit schwer alkylierbare Alkohole in Gegenwart von CsOH, Alkylbromid und TBAI erfolgreich umgesetzt werden.^[134] Bei dieser Veretherungsvariante wird der sogenannte *Cs-Effekt* ausgenutzt, der auf dem großen Kationenradius des Cs basiert. Aus diesem ergibt sich für das Cäsium-Ion sowohl die geringste Ladungsdichte als auch die größte Polarisierbarkeit in der Reihe der Alkalimetalle. Bei Solvatisierung durch aprotisch-polare Lösungsmittel wie z. B. DMF resultiert für Cs-Alkoxide daher eine größere Nukleophilie als z. B. für Na-Alkoxide. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mit diesem Verfahren bereits zweifach substituierte Amine nicht zum tertiären Amin weiterreagieren.^[135] Dieser Befund wurde mit sterischer Hinderung sowie mit einer abgeschwächten Nukleophilie des

verstärkt an Cs koordinierenden sekundären Amins begründet (Abb. 4-8).^[136] Die CsOH-Methode erschien daher als ein vielversprechender Ansatz um in Gegenwart des durch ‚Neamin‘ und Boc zweifach substituierten Amins in **46** die Position 4'-OH selektiv zu alkylieren.

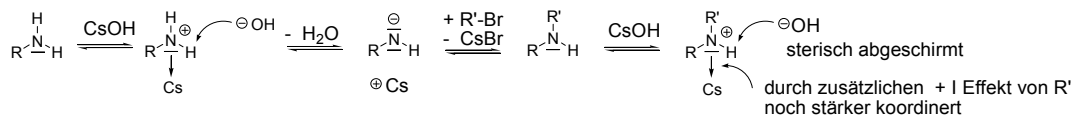


Abb. 4-8 | Erklärungsansatz der mono-*N*-Alkylierung bei Anwendung der CsOH-Methode | Nach Umsetzung des primären Amins zum monoalkylierten Produkt wird die erhöhte Nukleophilie des Amins durch eine verstärkte Koordination an das Cäsiumion abgefangen, zusätzlich erschwert der erhöhte sterische Anspruch des quaternären Ammoniumsalzes die Abstraktion des verbliebenen Protons.

Bei der Anwendung der CsOH-Methode auf **46** wurden bei der DC-Reaktionskontrolle zwei dicht beieinander laufende mit Ninhydrin anfärbbare Verbindungen detektiert ($R_f = 0.23$ und 0.25), die durch Säulenchromatografie über Kieselgel voneinander getrennt werden konnten. Bei der Verbindung mit $R_f = 0.23$ handelte es sich, belegt durch ^1H - bzw. ^{13}C -NMR-Spektren sowie ESI-MS-Analyse, um das Edukt **46** (78 %). Die zweite Substanz mit $R_f = 0.25$ konnte in einer vergleichenden DC-Kontrolle deutlich vom Edukt **46** und auch dem unerwünschten *N*-alkylierten Neaminderivat **47** unterschieden werden. Sie besaß aber das gleiche m/z -Verhältnis wie **46**. Zudem fehlten in den ^1H - bzw. ^{13}C -NMR-Spektren die Signale der Propargylgruppe sowie das ^1H -NMR-Signal der 4'-OH-Funktion. Darüber hinaus waren die ^{13}C -NMR-Signale der 3'- bzw. 4'-CHs verschoben (Abb. 4-9). Eine Derivatisierung mit TBAF in analytischem Maßstab führte zur Bildung von **38**. Bei der isolierten Verbindung handelte es sich also mit großer Wahrscheinlichkeit um das Produkt einer vicinalen 3'→4'-*O*-Silylwanderung unter basischen Bedingungen.^[137] Dieser Reaktionsweg wurde bei der Veretherung mit NaH nicht beobachtet.

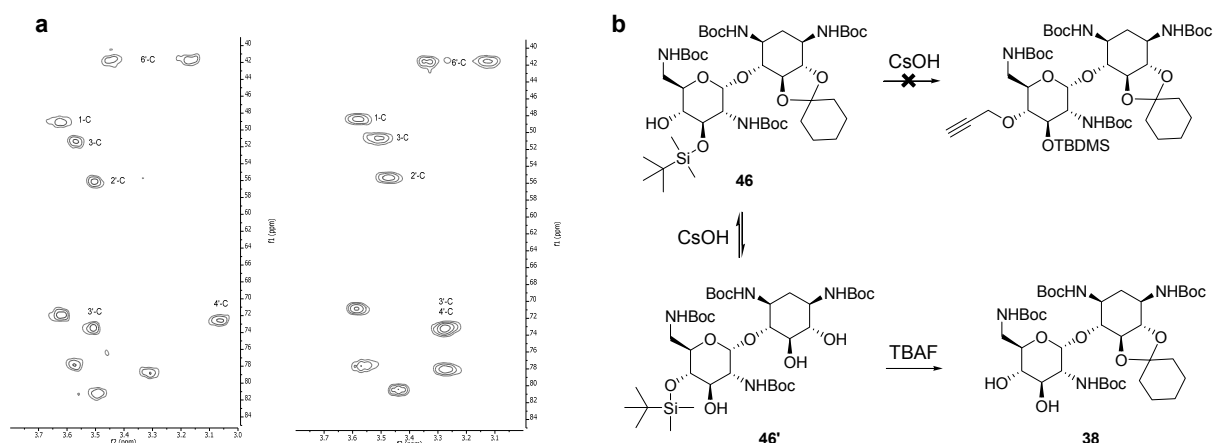


Abb. 4-9 | 3'→4'-*O*-Silylwanderung bei der Anwendung der CsOH-Methode | a Der Vergleich der C,H-COSY-NMR-Spektren von **46** und **46'** belegte eine Verschiebung der 3'- und 4'-CH-Signale | b Eine Umsetzung mit CsOH als Base führte nicht zum gewünschten 4'-*O*-propargylierten Produkt. Stattdessen wurde eine 3'→4'-*O*-Silylwanderung beobachtet.

Darüber hinaus führte die Umsetzung von **46** mit KOtBu als Base ebenso nicht zum gewünschten 4'-O-propargylierten Produkt.^[138] Stattdessen wurde erneut ein Gemisch aus Edukt **46** und Migrationsprodukt **46'** erhalten. Eine 3'→4'-O-Silylmigration wurde außerdem auch bei der Reaktion von Propargylbromid mit NaH und einem Azido-geschützten Neaminanalogon beobachtet (Abb. 4-10).^[63a] Die dadurch gewonnenen O-propargylierten Azidoneaminverbindungen **50** und **51'** waren durch Säulenchromatografie jedoch nicht trennbar. Eine Folgereaktion zum intramolekularen Cyclisierungsprodukt wurde nicht beobachtet (vgl. Abb. 4-1).

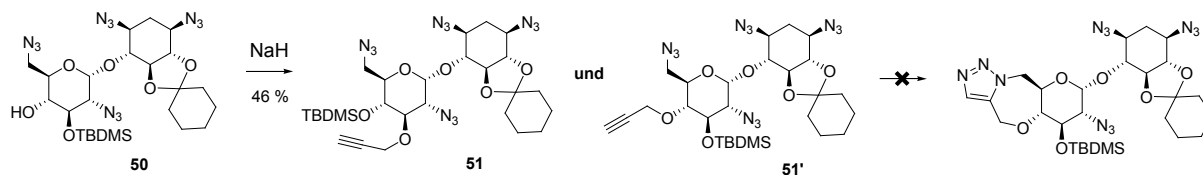


Abb. 4-10 | Synthese von O-propargylierten Azidoneaminverbindungen

Da keine der vorgestellten Methoden zum gewünschten 4'-O-propargylierten Neamin führte, wurde das 6'-N-alkinylierte Neamin **49** für den Aufbau der Substanzbibliothek genutzt. Aufgrund der schlechten Gesamtausbeute bei der Synthese von **33** wurde auf eine weitere Derivatisierung in Form einer Pentinylierung wie im 2-Desoxystreptamin verzichtet.

4-1.3 | Synthese der Bisazide

Das gleichzeitige Kontaktieren zweier ungepaarter prä-miRNA-Bereiche durch dimerisierte Aminoglykoside war die zugrunde liegende Strategie um die miRNA-Reifung potent und selektiv zu inhibieren. Angesichts dessen spielen Länge und Rigidität des Abstandhalters eine zentrale Rolle. Dies hatte sich z. B. deutlich bei den Kanamycin-A-Verbindungen von Disney *et al.* gezeigt, in denen die multiple Präsentation des Aminoglykosids durch Einschübe im Peptoidrückgrat definiert eingestellt werden konnte (Kap. 2-7.5).^[139] Je nach Flexibilität des Rückgrats oder Abstand der Kanamycin-A-Einheiten konkurrierten diese multivalenten Verbindungen in unterschiedlichem Ausmaß mit dem MBNL1-Protein um die Bindung eines repetitiven CUG-RNA-Schleifenmotivs. Nicht zu unterschätzen ist zudem der Einfluss wässriger Medien bei der Verwendung unpolarer Alkylketten als Linker. Solche Kohlenwasserstoffe zeigen die Tendenz, sich in polaren Medien „ineinander zu lösen“, um die exponierte hydrophobe Oberfläche zu minimieren.^[91] Als Konsequenz verringert sich die Distanz der konjugierten Aminoglykoside. Neben ihrer Funktion als Abstandshalter können Linker aber auch selbst einen Beitrag zur RNA-Bindung leisten. Stabilisiert durch den π -Stacking-Effekt neigen v. a. planare aromatische Ringsysteme zur Interkalation. Da die „große“ Furche von RNA-Helices jedoch enger und tiefer ist, wird ein solcher Bindungsmodus meist nur in DNA-Duplexen beobachtet. Eines der wenigen Beispiele RNA-interkalierender Verbindungen ist das 2-Phenylcholin-enthaltende, cyclische Peptid von Krishnamurthy

et al., das sich in eine von einem *bulge* aufgeweitete Duplexregion hereinschraubt (vgl. Kap. 2-6).^[70] Hinsichtlich einer bivalenten Bindung von prä-miRNAs war eine gezielte Wahl solcher Linker jedoch aufgrund der bislang nur unpräzise vorhersagbaren dreidimensionalen prä-miRNA-Strukturen nicht möglich. Daher sollten die Bisazide in Länge, Starrheit und ihrer chemischen Natur möglichst divers sein. Es wurden hydrophobe, hydrophile, starre, flexible und auch interkalierende Zielverbindungen ausgewählt, die sich mit einem bekannten Repertoire an Methoden, ausgehend von kommerziell erhältlichen Edukten, mit wenig Aufwand synthetisieren lassen.

Nukleophile Substitution | Die Synthese der Bisazide **A1** bis **A5** durch nukleophile Substitution (Abb. 4-11) gelang ausgehend vom entsprechenden Bishalogenid mit einem dreifachen Überschuss NaN_3 , unterstützt durch den Einsatz von Dicyclohexano-18-Krone-6. Dabei variierten die Ausbeuten zwischen 56 und 99 %. Eine säulenchromatografische Reinigung über Kieselgel war in der Regel nicht nötig, da diese Verbindungen nach Aufarbeitung mittels Et_2O -Extraktion analysenrein erhalten wurden.

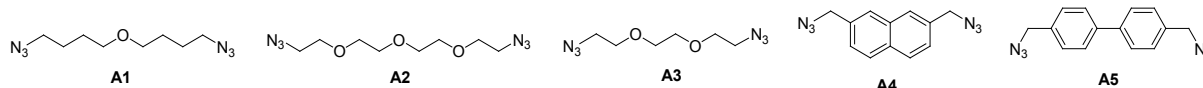


Abb. 4-11 | Strukturen der Bisazide **A1** - **A5**

46

Diazotransfer an aliphatischen Bisaminen | Für die Überführung aliphatischer Bisamine wurden zwei verschiedene Diazotransfermethoden genutzt. Zum einen kam für die Synthese des **A6** (Abb. 4-12) Trifluormethansulfonylazid **52** zum Einsatz.^[140] Dessen Synthese durch Verwendung von NaN_3 , Cu^{II} -Salzen und Trifluormethansulfonsäureanhydrid ist allerdings kostenintensiv, bedarf großer Überschüsse toxischer Reagenzien und ist schlecht reproduzierbar. Zudem wird **52** in Abwesenheit von Lösungsmitteln als explosiv beschrieben.^[141] Darüber hinaus war die Ausbeute des Diazotransfers von Bis(3-aminopropyl)ether mit Hilfe von **52** mit nur 21% nur wenig zufriedenstellend. Daher wurde für die Synthese von **A7** die Tauglichkeit des Imidazol-1-sulfonylazid Hydrochlorids **53** untersucht.^[142] Imidazylate werden in ihrer Reaktivität den Triflaten als sehr ähnlich beschrieben, sind aber kostengünstiger sowie einfacher und vor allem sicherer herzustellen.^[143] Die Synthese von **53** gelang mit 72 % Ausbeute ausgehend von NaN_3 , Sulfurylchlorid und Imidazol. Um es in die lagerstabile Hydrochloridform zu überführen, wurde das Imidazylazid in EtOAc gelöst und durch langsames Zutropfen einer ethanolischen HCl -Lösung ausgefällt. Die Umsetzung mit **53** in Gegenwart von K_2CO_3 und Cu^{II} -Ionen ermöglichte die Isolierung des gewünschten Produktes **A7** mit einer Ausbeute von 76 %.



Abb. 4-12 | Strukturen der Bisazide **A6** und **A7**

Diazotransfer an aromatischen Bisaminen | Für die Konversion aromatischer Bisamine in die Azide **A8** bis **A20** (Abb. 4-13) wurden *tert*-Butylnitrit sowie Trimethylsilylazid im Überschuss eingesetzt.^[144] Mit diesen milden Bedingungen, der Verwendung nicht-explosiver Reagenzien und vor allem mit den erzielten Ausbeuten zwischen 60 - 98 % stellte diese Methode eine attraktive Alternative zur Verwendung von Trifluormethansulfonylazid **52** oder Diazoniumsalzen dar.^[145]

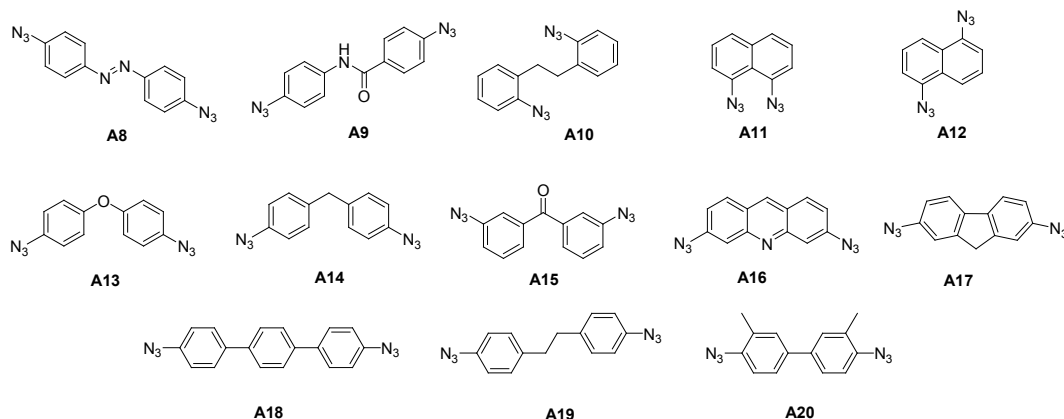


Abb. 4-13 | Strukturen der Bisazide **A8** - **A20**

Verlängerung aromatischer Bisamine durch Chloracetylchlorid | Um neben der chemischen Natur der Linker auch die Länge zu modulieren, wurden ausgewählte aromatische Bisamine mit Chloracetylchlorid umgesetzt und das verbleibende Chlorid nukleophil durch Azid substituiert (Abb. 4-14).^[104] Nach Präzipitation des in DMF gelösten Produktes mit H₂O und anschließender Filtration wurden die jeweiligen Produkte analyserein mit Ausbeuten zwischen 19-83 % erhalten.

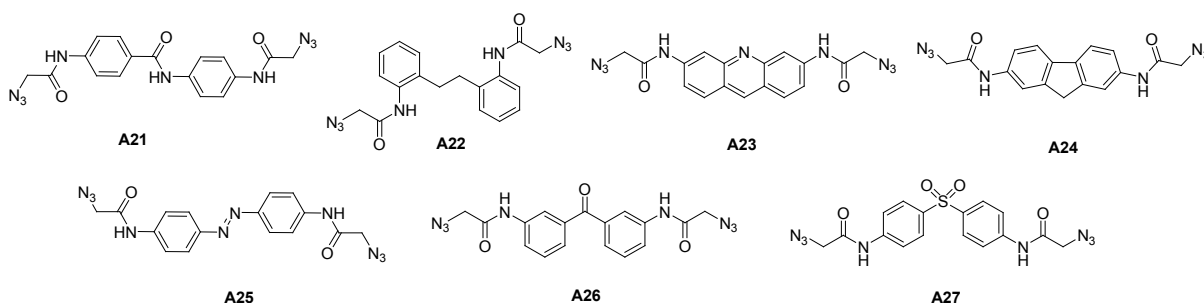


Abb. 4-14 | Strukturen der Bisazide **A21** - **A27**

Zusammen mit den eigens synthetisierten und im Arbeitskreis bereits vorhandenen bzw. kommerziell erworbenen Aziden (Abb. 4-15) standen für die Verknüpfung alkinylierter Aminoglykosidderivate durch CuAAC insgesamt 41 Bisazide, ein Monoazid sowie ein Trisazid zur Verfügung. Bei dem von Dr. Denny Proksch synthetisierten Monoazid **A42** handelt es sich um eine reduzierte Form von Tylophorin B. Diese Verbindung wurde in einer Studie zu Wechselwirkungen zwischen niedermolekularen Verbindungen und der Tabakmosaikvirus-RNA als Binder von Haarnadelschleifen identifiziert.^[146]

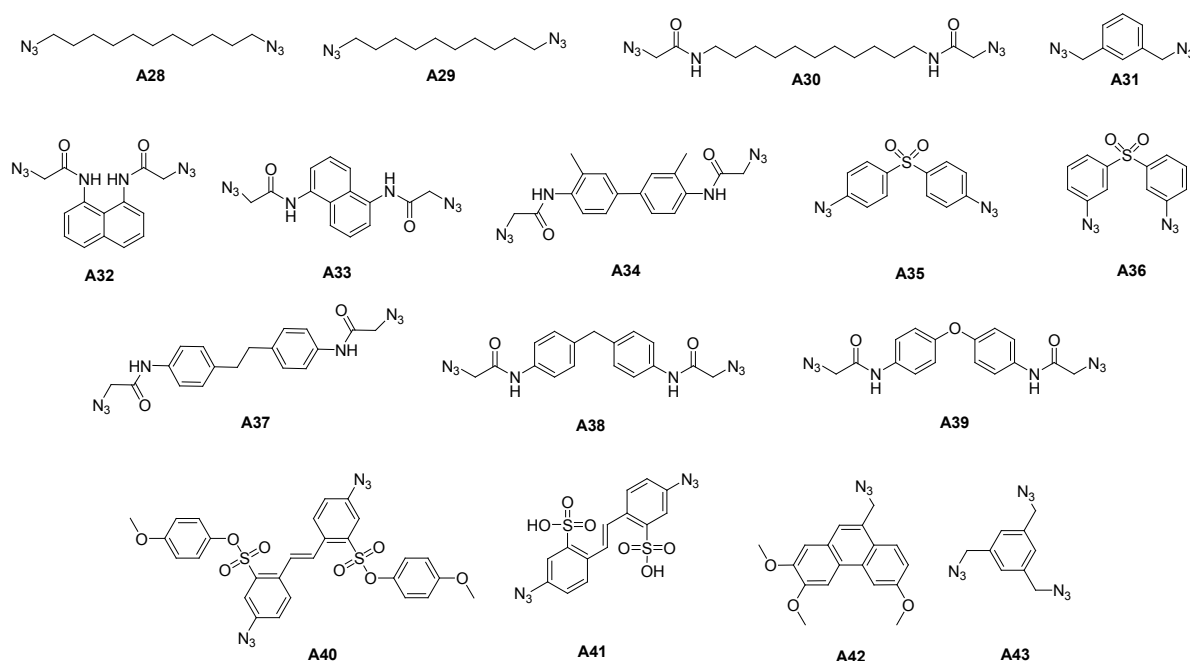


Abb. 4-15 | Strukturen der Bisazide A28 - A41, des Monoazids A42 und des Trisazids A43

4-1.4 | Aufbau der Substanzbibliothek durch CuAAC

48

Nach Abschluss der Synthese Alkin- und Azid-modifizierter Bausteine wurde mit dem Aufbau der kombinatorischen Bibliothek durch CuAAC begonnen. Aufgrund der Vielzahl an geplanten Reaktionen, war ein sparsamer Umgang mit den Alkinen geboten. Daher sollten die Umsetzungen im μmol -Maßstab erfolgen. Da die Zielverbindungen aber gleichzeitig in einer Größenordnung hergestellt werden mussten, die eine vollständige Charakterisierung durch NMR- sowie massenspektrometrische Analyse erlaubt und ferner einwägbare Mengen für die Reifungsassays benötigt wurden, war die Ausbeute der CuAAC ein wichtiges Kriterium. Angesichts des angestrebten Umfangs der Substanzbibliothek war eine Fall-zu-Fall-Optimierung der Reaktions- und Reinigungsbedingungen jedoch ausgeschlossen. Daher musste ein Set-up gefunden werden, welches gegenüber strukturellen oder elektronischen Variationen der offerierten Grundbausteine ausreichend robust war.

Die ersten Versuche zum Aufbau der Substanzbibliothek orientierten sich zunächst an der Vorschrift von Thomas *et al.* (Abb. 4-16a).^[104] In dieser wurden katalytische Mengen $[\text{Cu}(\text{MeCN})_4]\text{PF}_6$ mit den Bisaziden und einem geringen Überschuss 2-DOS-Alkin in DMSO gelöst und die Reaktionslösung für 40 sek durch Mikrowellenstrahlung erhitzt. Anschließend sollte unverbrauchtes 2-DOS-Alkin durch Schütteln mit Azidomethyl-Polystyrol-Harz aus dem Reaktionsgemisch entfernt werden. Die finale Reinigung des Produktes sah die Zugabe von *p*-Toluensulfonsäure-Harz vor, um mittels *catch-and-release*-Technik das dimerisierte 2-DOS-Konjugat zu isolieren. Jedoch führte bereits die Mikrowellensynthese zu keiner Umsetzung des Eduktes und musste daher abgeändert werden (Abb. 4-16b): Die Ansatzgröße wurde verdoppelt, die Kupferspezies *in situ*

durch Reduktion von $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ mit Natriumascorbat (NaAsc) generiert und TBTA als Cu^{I} -stabilisierender Ligand zugesetzt.^[63a] Die Reaktionslösung wurde mit Ar entgast und dann entweder in einer Mikrowelle (3 h, 50 °C) oder einem Thermoschüttler (7 d, 35 - 50 °C) platziert. Der Reaktionsfortschritt wurde per DC verfolgt. Spätestens nach 7 d wurde die Reaktion trotz unvollständigem Eduktumsatz abgebrochen. Da sich auch die vorgeschlagene Harz-basierte Reinigungsmethode als unbrauchbar erwies, wurden die Rohprodukte mittels Säulenchromatografie über Kieselgel und einem wässrigem NH_3 /Methanol-Laufmittelgemisch gereinigt. Unter den gewählten Bedingungen blieb das Kupfersalz als grün-blauer Rückstand im oberen Abschnitt der stationären Phase zurück, Bisazid sowie monovalentes Konjugat eluierten zuerst, dann das unverbrauchte Alkin und schließlich das gewünschte bivalente Produkt. Angesichts des Synthesemaßstabs und dieses anspruchsvollen Trennproblems war die Isolierung des gewünschten Produktes in der Regel sehr aufwändig. Zudem erschwerte und verlangsamte der Anteil von bis zu 50 % konz. NH_3 in der mobilen Phase sowohl die Durchführung der Chromatografie als auch das Detektieren bzw. Aufkonzentrieren der produktenthaltenden Fraktionen. Zwar konnten mit dieser Methode einige Verbindungen mit Ausbeuten von ca. 10 % (1 - 2 mg) isoliert werden, jedoch musste sich deren Charakterisierung aufgrund der geringen Menge meist auf ^1H -NMR-Spektroskopie beschränken. Zudem konnte eine mögliche Kontamination durch eluiertes Kieselgel nicht ausgeschlossen werden. Durch die benannten Limitationen war dieses Verfahren für den Aufbau der Substanzbibliothek durch CuAAC insgesamt ungeeignet.

49

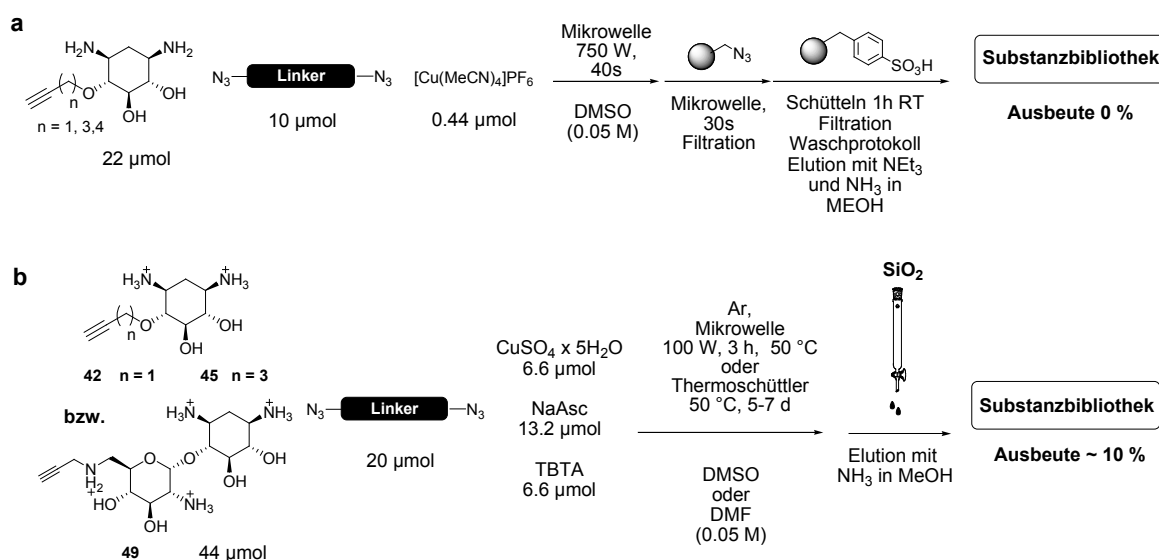


Abb. 4-16 | Aufbau der Substanzbibliothek durch CuAAC mit ungeschützten Alkinbausteinen | **a** Die Methode nach Thomas *et al.* führte gemäß DC-Kontrolle zu keiner Produktbildung. Erst das Ausweichen auf das Verfahren **b** mit anderen Reagenzien, Stoffmengen und Reinigungsprotokoll ermöglichte die Isolierung von Dimeren.

Kernpunkt der konzeptionellen Neuausrichtung der Synthesestrategie war die Verwendung der Boc- sowie Cyclohexylden-geschützten Verbindungen **41**, **44** oder **48**, die in zweifachem Überschuss zum Bisazid und dem Kupfer-kordinierenden Liganden

TBTA eingesetzt wurden (Abb. 4-17). Nach kurzem Entgasen mit Ar wurden erst NaAsc und dann $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ hinzugefügt. Bis zu 15 Ansätze wurden parallel bei 50° C in einem Thermoschüttler bewegt und der Fortschritt der Reaktion alle 24 h mittels DC überprüft. Die meisten Bisazide waren spätestens nach 3 d vollständig umgesetzt. In den Fällen einer unvollständigen Umsetzung wurde ein weiteres Aliquot Alkin sowie Kupfer und NaAsc zugesetzt, erneut entgast und die Reaktion für 2 d fortgesetzt. Die Zielverbindungen wurden durch säulenchromatografische Trennung über Kieselgel unter Nutzung eines festen Gradientenprotokolls entweder mit EtOAc/Cyclohexan für die 2-DOS- oder MeOH/ CH_2Cl_2 für die Neamin-Konjugate isoliert. Die Abspaltung der Schutzgruppen gelang mit HCl in 1,4-Dioxan und bildete zusammen mit einer RP_{18} -Filtration über fertig gepackte *CHROMABOND*®-Säulen den Abschluss der Synthesesequenz.

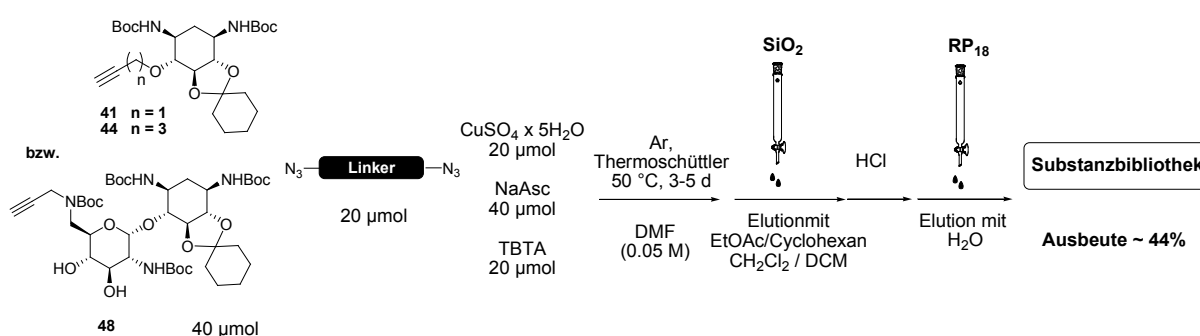


Abb. 4-17 | Aufbau der Substanzbibliothek durch CuAAC mit geschützten Alkinbausteinen

50

Obwohl dieses Vorgehen einen zusätzlichen Zwischenschritt zur Entfernung der säurelabilen Schutzgruppen beinhaltete und die Synthese aller drei Alkin-modifizierten Grundbausteine wiederholt werden musste, erwies sich diese simple Abänderung der Synthesestrategie als überaus praktikabel. In den meisten Fällen wurde nun bereits nach 3 d ein vollständiger Umsatz des Bisazids verzeichnet. Die damit verbundene Vereinfachung des Trennproblems gestattete eine säulenchromatografische Reinigung über Kieselgel nach einem festen Gradientenprotokoll. Zudem ermöglichte die herabgesetzte Polarität der zu reinigenden Dimere Laufmittelgemische, die den Aufwand bei der Identifizierung der Produkt enthaltenden Fraktionen sowie die Dauer beim Einengen dieser Fraktionen reduzierten. Die isolierten Ausbeuten variierten einerseits mit Werten zwischen 5 und 98 % sehr stark, vermutlich als Ergebnis der immer gleichen Elutionsbedingungen in der säulenchromatografischen Reinigung für strukturell sehr diverse Bisazide, liegen aber durchschnittlich bei 44 %. Jede angestrebte Zielverbindung konnte mit diesem Protokoll hergestellt werden (Tab. 4-1). Da aber die Optimierung der Synthese des pentinylierten 2-DOS erst in der Schlussphase der Dissertation erfolgte und sich auch die Synthese des propargylierten Neamins als anspruchsvoll erwies, wurden für diese Aminoglykoside nicht alle Kombinationen erfasst. Insgesamt wurden 88 Verbindungen synthetisiert (s. Tab. 4.1) und abschließend umfassend charakterisiert, um die Auswertung der nachfolgenden Screeningergebnisse auf eine solide Grundlage zu stellen. Neben hochauflöser Massenspektrometrie und

^1H - bzw. ^{13}C -NMR-Spektroskopie wurden zusätzlich UPLC/UV-Vis/MS-Analysen im Absorptionsbereich von 200 bis 800 nm durchgeführt, die für alle Mitglieder der Substanzbibliothek eine hohe Reinheit konstatierten ($\geq 90\%$).

Neben den selbst hergestellten Verbindungen enthielt die Bibliothek die kommerziell verfügbaren Aminoglykoside Kanamycin A **KA**, Kanamycin B **KB**, Neomycin B **NO**, Streptomycin **STR**, Dihydrostreptomycin **DHS** sowie 2-Desoxystreptamin **29**, Neamin **35**, 4-*O*-Propargyl-2-desoxystreptamin **42** und 6'-*N*-Propargylneamin **49** in ihrer Hydrochloridform.

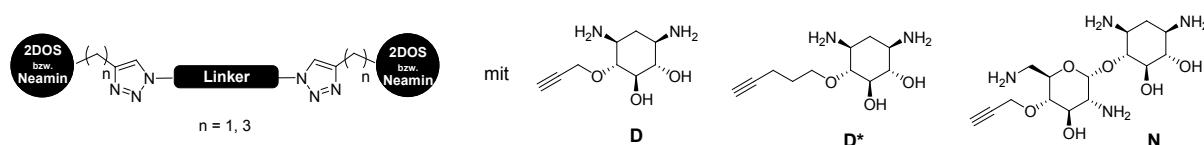
Für eine bessere Übersicht werden an dieser Stelle für die alkylierten Neamin- und 2-DOS-Derivate, die für die CuAAC zum Einsatz kamen, folgende Abkürzungen eingeführt:

D für 4-*O*-Propargyl-2-desoxystreptamin,

D* für 4-*O*-Pentynyl-2-desoxystreptamin und

N für 6'-*N*-Propargylneamin.

Tab. 4-1 | Tabellarischer Überblick aller synthetisierten Kombinationen | ☑ = bivalentes Konjugat isoliert | ⊙ = zusätzlich monovalentes Konjugat isoliert | ☒ = CuAAC nicht durchgeführt.



Bisazid	D	D*	N	Bisazid	D	D*	N
A1	☑	☑	☑	A23	☑	☒	☒
A2	☑	☑	☑	A24	☑	☒	☒
A3	☑	☑	☑	A25	☑	☒	☒
A4	☑	☒	☒	A26	☑	☒	☒
A5	☑	☑	⊙☑	A27	☑	☑	☑
A6	☑	☑	☑	A28	☑	☒	☒
A7	☑	☒	☒	A29	☑	☒	☒
A8	☑	☑	☑	A30	☑	☒	☒
A9	☑	☑	☑	A31	☑	☒	☑
A10	☑	☑	☑	A32	☑	☑	☑
A11	☑	☒	☒	A33	☑	☒	☒
A12	☑	☑	☒	A34	☑	☑	☑
A13	☑	☑	☒	A35	☑	☑	☑
A14	☑	☑	☒	A36	☑	☑	☑
A15	☑	☒	☒	A37	☑	☑	☑
A16	☑	☑	☒	A38	☑	☒	☒
A17	☑	☑	☑	A39	☑	☑	☑
A18	☑	☑	☒	A40	☑	☒	☒
A19	☑	☑	☒	A41	☑	☒	☒
A20	☑	☑	☑	A42	☑	☒	☒
A21	☑	☑	☑	A43	☑	☒	☒
A22	☑	☑	☑				

4-2 | Durchführung und Auswertung des Screenings

4-2.1 | Hintergrundinformationen zur Durchführung des Reifungsassays

Für das Screening der Substanzbibliothek wurde der im Arbeitskreis Arenz von Neubacher *et al.* entwickelte BRCA-basierte Reifungsassay verwendet (vgl. Kap. 2-9).^[110] Dieser detektiert die miRNA-Reifung in zwei nacheinander geschalteten enzymatischen Reaktionen: einem *Dicer*-vermittelten Reifungsschritt und einem Detektionsschritt in Gegenwart von *SYBR® Gold*. Die Detektion beruht auf einer *Bst*-Polymerase-vermittelten Amplifikation eines DNA-Oligonukleotids, die nur durch eine reife miRNA eingeleitet werden kann und sich durch den Anstieg der *SYBR®-Gold*-Fluoreszenz quantifiziert lässt. Um gezielt nach selektiven Inhibitoren zu suchen, wurden kompetitive Assays durchgeführt. Dafür wurden entweder die humane prä-miR-21 und die humane prä-miR-122 oder die aus *D. melanogaster* stammenden prä-let7 und prä-Bantam (Abb. 4-18a) mit potentiellen Inhibitoren paarweise der *Dicer*-vermittelten Spaltung unterworfen. Im nachfolgenden sequenzspezifischen BRCA-Detektionsschritt sollten dann etwaige Präferenzen eines Inhibitors für eine der beiden prä-miRNAs zutage treten.

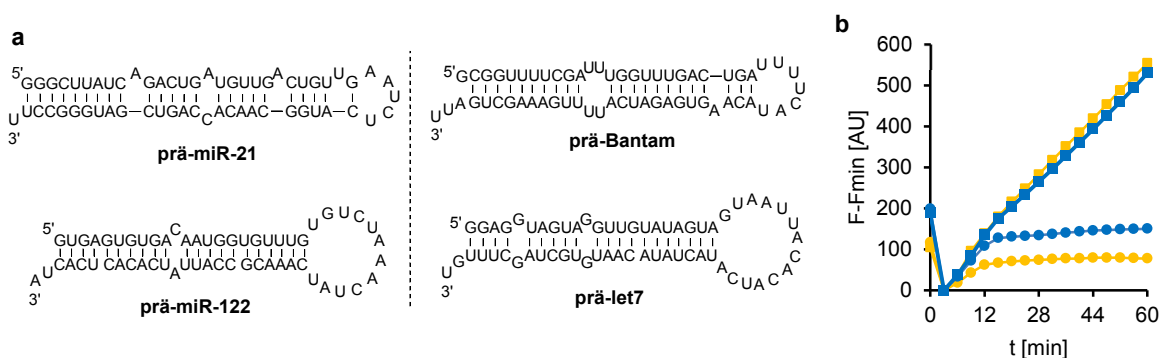


Abb. 4-18 | Informationen zum BRCA-Reifungsassay | **a** Sekundärstrukturen der gewählten prä-miRNA-Paare, modelliert mit *Mfold*. | **b** Darstellung eines ausgewählten Beispiels zur Bestimmung der Maximal- und Minimalsteigung. Aufgetragen ist der Mittelwert aus einer dreifach bestimmten Fluoreszenzintensität ($F-F_{\min}$) pro min für das prä miR-Paar let7/Bantam. Nach einer Initiationsphase von ca. 10 min, nimmt die Fluoreszenzintensität der Positivkontrolle (■ Bantam, ■ let7) stark zu, die Fluoreszenzintensität der Negativkontrolle (● Bantam, ● let7) bleibt hingegen minimal.

Die Inhibitionswerte wurden aus der linearen Regression des Kurvenanstiegs im Zeitraum zwischen 20 und 60 min berechnet und auf die Maximal- und Minimalsteigung normiert (Abb. 4-18b). Um den minimalen Fluoreszenzanstieg zu bestimmen (Negativkontrolle, = 100 % Inhibition), wurden prä-miRNAs in Abwesenheit von Testsubstanzen und *Dicer* bei 37 °C inkubiert. Für die Ermittlung der Maximalsteigung (Positivkontrolle, = 0 % Inhibition) wurden prä-miRNAs in Abwesenheit von Testsubstanzen aber mit *Dicer* bei 37 °C inkubiert. Um darüber hinaus zu prüfen, ob die Testsubstanzen ausschließlich den *Dicer*-Reifungsschritt inhibieren und nicht die enzymatische Amplifikation des Detektionsschrittes, wurden für ausgewählte

Verbindungen BRCA-Kontrollmessungen durchgeführt. In diesen wurden die Inhibitoren erst nach dem *Dicer*-Reifungsschritt zugefügt.

4-2.2 | Aminoglykoside als Inhibitoren der miRNA-Reifung

Im Zusammenhang mit der Inhibition der miRNA-Reifung durch Aminoglykoside stellten Maiti *et al.* vor kurzem Bindungs- und Inhibitionsstudien an der prä-miR-155 vor.^[72] Dabei wurden für Kanamycin A und B sowie Neomycin B Bindungsdissoziationskonstanten im μM Konzentrationsbereich bestimmt. Um zu ermitteln, inwiefern das die miR-155-Reifung beeinflusst, wurde eine ^{33}P -markierte prä-miR-155 in Gegenwart dieser Aminoglykoside (1 mM) mit *Dicer* behandelt und die Spaltungsprodukte durch eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Den Ergebnissen dieser Analyse zufolge, konnten weder Kanamycin A oder B noch Neomycin B die miR-155-Reifung hemmen.

Um zu prüfen, ob Neomycin B, Kanamycin A und Kanamycin B prinzipiell ungeeignet sind, die miRNA-Reifung zu inhibieren, wurden sie bei einer Konzentration von 50 μM mit den Paaren prä-miR-21/122 und prä-let7/Bantam auf eine Inhibition getestet (Abb. 4-19). Dabei wurde festgestellt, dass alle drei Verbindungen die Reifung der prä-let7, prä-miR-21 und -122 inhibieren konnten. Die Aminoglykoside Kanamycin A und B sowie Neomycin B unterscheiden sich voneinander durch die Anzahl und Position der Aminogruppen. Während Neomycin B sechs davon aufweist, besitzt Kanamycin B fünf und Kanamycin A nur vier Aminofunktionen. In Übereinstimmung mit den Kenntnissen über die Relevanz elektrostatischer Wechselwirkungen bei der RNA-Erkennung nehmen die Inhibitionswerte in der Reihe NO, KB, KA gegen die prä-let7, prä-miR-21 sowie -122 ab. Die Beobachtung, dass die Aminoglykoside die Reifung der hier gewählten miRNAs bei einer Konzentration von 50 μM inhibieren können, stellt die Ergebnisse von Maiti *et al.* jedoch nicht zwangsläufig infrage, denn es ist vorstellbar, dass Aminoglykoside in Regionen einer prä-miRNA binden, die für eine effektive Prozessierung durch *Dicer* nicht relevant sind. Dies könnte möglicherweise auch die Erklärung dafür sein, warum die Bantam-Reifung von keinem der Aminoglykoside inhibiert wurde, lediglich Neomycin B zeigte mit einem Inhibitionswert von 14 % einen minimalen Effekt.

53

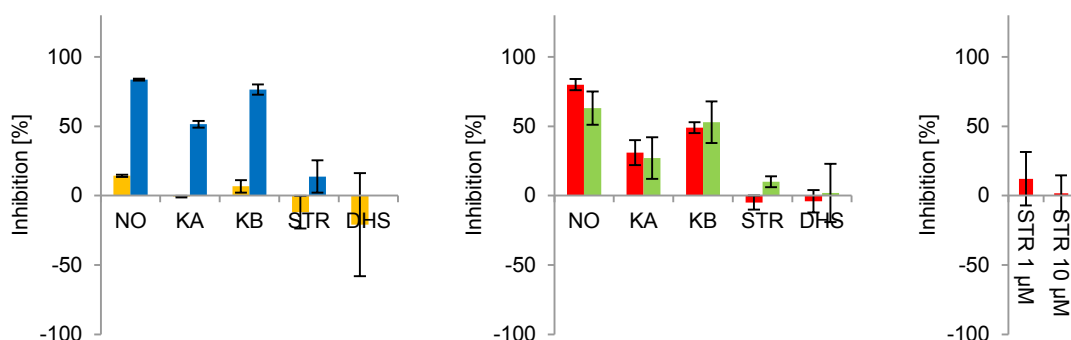


Abb. 4-19 | Aminoglykoside als Inhibitoren der miRNA-Reifung | Konzentration für NO, KA, KB, STR, DHS in kompetitiven Assays: 50 μM , Farblgende: **Prä-Bantam** **Prä-let7** **Prä-miR-21** **Prä-miR 122**

In einer weiteren Untersuchung, die das Wechselspiel von Aminoglykosiden und miRNA-Reifung thematisiert, wurde Streptomycin von Bose *et al.* in einem Reportgen-Assay bei einer Konzentration von 5 μM als selektiver Inhibitor der miR-21-Funktion identifiziert.^[62] Aus den Ergebnissen von UV-Denaturierungs- und *Footprinting*-Experimenten leiteten die Autoren als Wirkmechanismus eine Bindung an die prä-miR-21 ab, die den *Dicer*-vermittelten Reifungsschritt hemmt. Dihydrostreptomycin diente in dieser Studie als Kontrollsubstanz und zeigte nur eine geringe Bindungsaffinität sowie Inhibition der mir-21-Funktion. Um diese Ergebnisse nachzuvollziehen, wurden sowohl Streptomycin als auch Dihydrostreptomycin im BRCA-Reifungsassay bei einer Konzentration von 50 μM gegen die prä-miR-21/122 und prä-let7/Bantam auf ihr inhibitorisches Potential getestet (Abb. 4-19). Darüber hinaus wurde Streptomycin bei einer Konzentration von 1 und 10 μM ohne eine konkurrierende prä-miRNA untersucht. Die in allen Messungen ermittelten Inhibitionswerte für das vermeintlich potente und selektive Streptomycin liegen im Bereich von 0 % und stehen in deutlichem Kontrast zu den Ergebnissen von Bose *et al.*

4-2.3 | Identifizierung von Inhibitoren der miRNA-Reifung

Für das Screening der Substanzbibliothek nach Inhibitoren der miRNA-Reifung wurden alle Testsubstanzen in Wasser gelöst und unter kompetitiven Bedingungen im BRCA-Reifungsassay untersucht. Aufgrund der höheren Anzahl an Aminogruppen, war anzunehmen, dass die Neaminderivate besser inhibieren würden als die korrespondierenden 2-DOS-Derivate. Daher wurden erstere bei einer Konzentration von 0.5 μM und letztere bei 5 μM getestet. Dimere mit D oder D* als RNA-bindendes Motiv werden nachfolgend dann als potent bezeichnet, wenn bei einer Konzentration von 5 μM ein Inhibitionswert von ≥ 75 % ermittelt wurde. Für Neaminverbindungen N wurde ein Inhibitionswert von ≥ 50 % bei einer Konzentration von 0.5 μM zu Grunde gelegt. Dieser Definition folgend, wurden im Screening der 88 Testsubstanzen 26 potente Inhibitoren der let7-Reifung identifiziert (Abb. 4-20). Darüber hinaus konnten aus der Bibliothek neun Substanzen die Bantam-, 21 die miR-21 und 13 Verbindungen die miR-122-Reifung potent hemmen. Eine Übersicht aller Screening-Ergebnisse befindet sich im Anhang. Im Vergleich der potenten Inhibitoren fällt für die Bantam-Reifung neben der allgemein geringen Anzahl an Inhibitoren auch die Abwesenheit von Neamin-enthaltenden Dimeren auf. Scheinbar ist eine hohe positive Gesamtladung kein Garant für eine effektive Inhibition. Die Ergebnisse aus den zuvor beschriebenen Reifungsassays mit Kanamycin A und B sowie Neomycin B als Testsubstanz stützen diese Interpretation.

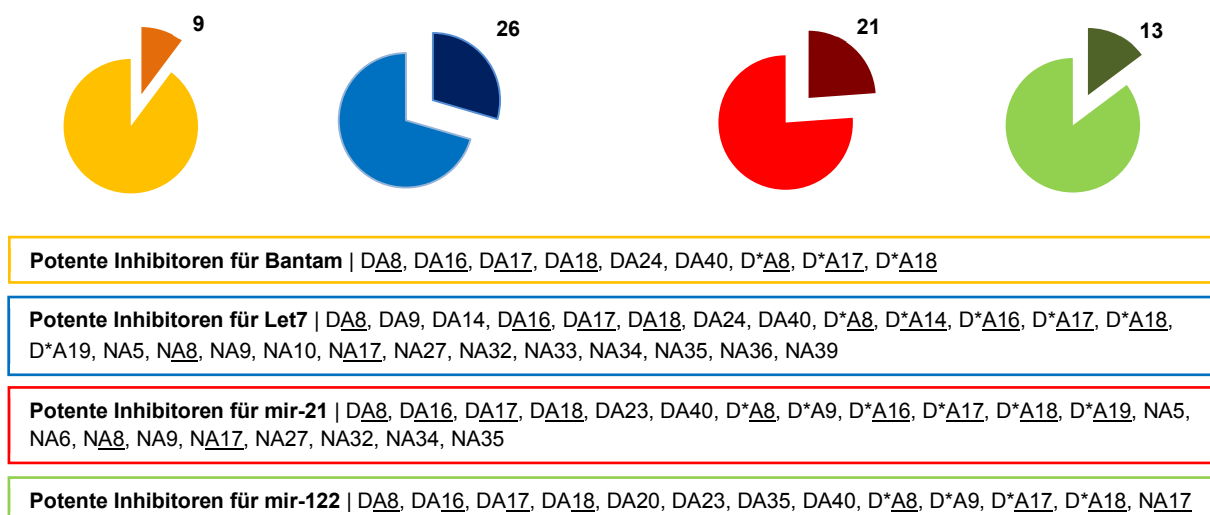


Abb. 4-20 | Potente Inhibitoren der miRNA-Reifung | Das Kreisdiagramm veranschaulicht den prozentualen Anteil der 88 Testsubstanzen, welche die miRNA-Reifung potent inhibieren konnten (dunkle Schattierung), besonders häufig auftretende (mind. sechsmal) Linkerstrukturen sind unterstrichen, Farblegende: **Prä-Bantam** **Prä-let7** **Prä-miR-21** **Prä-miR 122**.

Bereits die Inhibitionsstudien von Disney *et al.* an CUG-enthaltenden RNAs mit multivalenten Kanamycin-A-Verbindungen hatten zeigen können, dass der Abstand zum verbrückenden Rückgrat sowie dessen Flexibilität und auch der Abstand, in dem Kanamycin-A-Einheiten dargeboten wurden, bei der Inhibition eine Rolle spielen. Daher sollen die Ergebnisse des Screenings im Folgenden bezüglich Zusammenhängen zwischen der inhibitorischen Wirkung und Faktoren wie Länge, Flexibilität und Struktur der Bisazide analysiert werden.

55

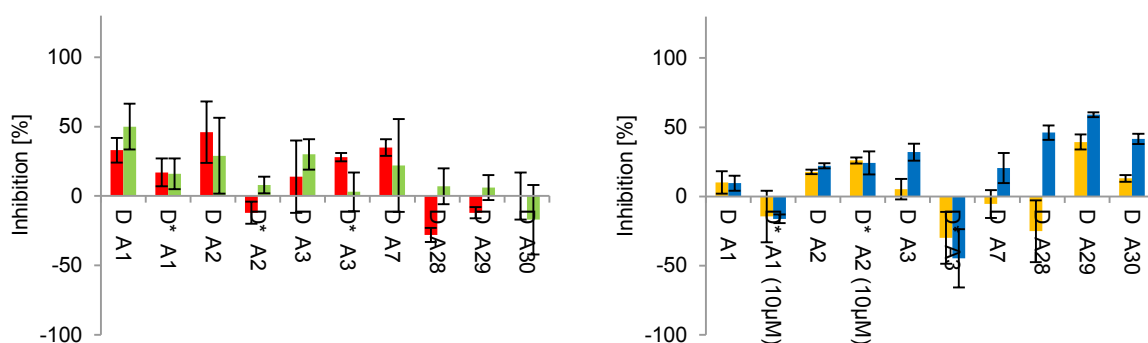


Abb. 4-21 | Vergleich der Inhibitionswerte flexibler Dimere | Flexible Linker auf Ethylenglykolbasis: A1, A2, A3, in Flexibilität eingeschränkter bicyclischer, nicht aromatischer Linker: A7, flexible aliphatische Linker: A28, 29, 30, Farblegende: **Prä-Bantam** **Prä-let7** **Prä-miR-21** **Prä-miR 122**.

Bei der Auswertung des Screenings wurde deutlich, dass Dimere, die über ein flexibles Bisazid verbrückt sind, die miRNA-Reifung in der Regel nicht potent inhibieren konnten. Die Gegenüberstellung von aliphatischen (A28, 29, 30) und glykolähnlichen Linkern (A1, 2, 3) für die jeweiligen prä-miRNA-Paare zeigt aber auch, dass je nach Zielstruktur der RNA, die Präferenzen für polare oder unpolare Linker unterschiedlich ausgeprägt sein können. Während die let7-Reifung tendenziell besser inhibiert wurde, wenn A28, 29 und 30 die verknüpfenden Bisazide waren, kehrt sich dieser Trend im Falle der miR-

21 Reifung um (Abb.4-21). Unter den Bisaziden befand sich außerdem der gesättigte, bicyclische Kohlenwasserstoff **A7**, dessen Anzahl an C-C-Bindungen in einer ähnlichen Größenordnung liegt wie bei den eben diskutierten nicht-cyclischen Bisaziden. Dessen Methylen-Cyclohexanstruktur macht das Dimer zwar weniger flexibel, trotzdem überstieg keiner der Inhibitionswerte 50 %. Die Azide **A13**, **14**, **15** und **35**, die dem **A7**-Gerüst strukturell sehr ähnlich, aber aromatisch sind, inhibierten hingegen die Reifung aller miRNAs tendenziell besser. Anhand dieses Beispiels wird deutlich, dass aromatische Dimere wahrscheinlich nicht nur besser inhibieren, weil sie rigide sind, sondern weil sie auch einen zusätzlichen Bindungsbeitrag leisten können z. B. durch π -Stacking mit den Nukleobasen. Diese Annahme festigt sich anhand eines Vergleichs der potenten Inhibitoren (Abb. 4-20) hinsichtlich der Häufung bestimmter Linkerstrukturen. Insbesondere Dimere auf Basis von Diazobenzen (**A8**), Anthracen (**A16**), Fluoren (**A17**) oder *p*-Terphenyl (**A18**) sind besonders zahlreich, d. h. mindestens sechsmal, vertreten. Verbindungen, die diesen Bisaziden strukturell sehr ähnlich sind, wurden in der Vergangenheit bereits als interkalierende Substanzen diskutiert, meist jedoch in Bezug auf DNA-Duplexe.^[147] Beispiele für Interkalatoren von RNA-Duplexen sind aufgrund der A-Typ-Helixstruktur und der sich daraus ergebenden Furchenform eher selten, aber nicht unbekannt.^[70, 148] Darüber hinaus wurden Diazobenzenderivate von Gumireddy *et al.* als spezifische Inhibitoren der mir-21-Funktion identifiziert, allerdings wird für diese Substanzen eher ein Wirkmechanismus auf der Ebene des miR-21-Gens vermutet (vgl. Abb. 2-8, **8**, **9**).

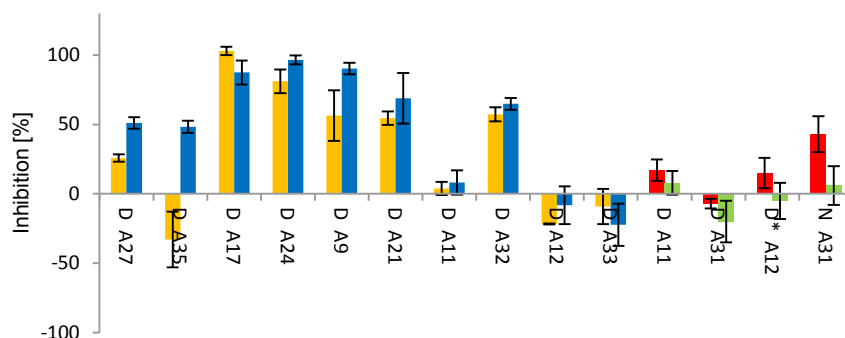


Abb. 4-22 | Vergleich der Inhibitionswerte unterschiedlich langer Dimere | Der Einfluss der Linkerlänge wird exemplarisch gezeigt an der let7/Bantam-Reifung, zusätzlich sind Inhibitionswerte für Dimere mit sehr kurzen Bisaziden (A11, 12, 31) für die miR21/122-Reifung angegeben, die Werte für die let7/Bantam-Reifung sind ähnlich, Farblegende: **Prä-Bantam** **Prä-let7** **Prä-miR-21** **Prä-miR 122**.

Um Information über den Einfluss der Linkerlänge zu erhalten wurde eine Reihe von aromatischen Bisaminen um jeweils eine Azidoacetyleinheit verlängert (**A27**→**A35**, **A17**→**24**, **A9**→**A21**, **A11**→**A32**, **A12**→**A33**). Die Auswertung des Screenings zeigt jedoch, dass dies nur wenig Einfluss auf die Inhibitionswerte hatte (Abb. 4-22). Nur die Inhibition der let7/Bantam-Reifung durch das 2-DOS-Dimer **DA11**, in dem die 2-DOS-Einheiten besonders dicht beieinander liegen, konnte von einer Verlängerung (→**DA32**) profitieren. Generell hatten Konjugate, die nur über kurze Linker wie **A11**, **12**, **31** ver-

brückt sind, schlechte Inhibitionswerte. Das galt selbst für **DA43**, dem einzigen Trimer unter den Testverbindungen, was verdeutlicht, dass eine hohe Gesamtladung allein für eine gute Inhibition nicht ausreichend ist.

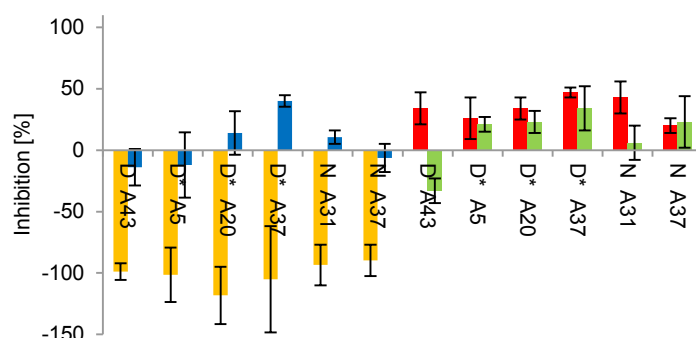


Abb. 4-23 | Phänomen der Reifungsaktivierung bei der Bantam-Reifung | Die gleichen Dimere zeigen gegenüber allen anderen miRNA-Reifungen einen inhibierenden oder keinen Effekt, Farblegende: **Prä-Bantam** **Prä-let7** **Prä-miR-21** **Prä-miR 122**.

Zuvor wurde bereits geschildert, dass die Bantam-Reifung durch Aminoglykoside wie Neomycin B, Kanamycin A, Kanamycin B und auch bivalente Neaminverbindungen nicht potent inhibiert werden konnte. Dafür wurde in den BRCA-Reifungsassays für einige Dimere (**DA43**, **D*A5**, **D*A20**, **D*A37**, **NA31**, **NA37**) statt eines positiven ein stark negativer Inhibitionswert (bis zu -100 %) ermittelt, der deutlich außerhalb des Fehlerbereichs der Messung lag und einer Aktivierung der Bantam-Reifung entspricht (Abb. 4-23). Der Grund dafür ist unbekannt. Eine Interaktion der Substanzen mit *Dicer* ist angesichts der Beschränkung auf die Bantam-Reifung wenig wahrscheinlich. Es wäre aber tatsächlich denkbar, dass eine Wechselwirkung der Dimere mit der prä-Bantam eine Prozessierung durch *Dicer* erleichtert. Auch in der Zelle gibt es Proteine wie z. B. *hnRNP A1*, die durch Wechselwirkung mit der *Hairpinloop*-Region einer pri-miRNA deren Spaltung erleichtern (vgl. Kap. 2-5).

57

4-2.4 | Untersuchungen zur selektiven Inhibition der miRNA-Reifung

Das Ziel dieser Arbeit war die Synthese und Identifizierung von Inhibitoren der miRNA-Reifung. Bezüglich dessen hatte das initiale Screening der 88 Testsubstanzen 9 potente Inhibitoren für die Bantam-, 26 für die let7-, 21 für die miR-21- und 13 für die miR-122-Reifung ergeben. Dass die Dimerisierung von 2-DOS- oder Neaminderivaten das Ausmaß der Inhibition steigern kann, wurde anhand eines Vergleichs mit den Inhibitionswerten von 2-DOS, Neamin sowie ihren Alkin-modifizierten Derivaten (**42** und **49**) deutlich. Keine dieser Verbindungen konnte bei Konzentrationen von 5 bzw. 0.5 μM die miRNA-Reifung potent inhibieren (Abb. 4-24). Ob die Erhöhung der inhibitorischen Potenz dabei maßgeblich auf einem bindungsfördernden Beitrag der (aromatischen) Linker oder auf die Verdopplung der 2-DOS- bzw. Neaminanzahl zurückzuführen ist, wurde in dieser Arbeit nicht näher untersucht. Interessanter erschien die Frage nach der Selektivität solcher Dimere. Die Arbeitshypothese war, dass durch das Anbieten eines

bivalenten Aminoglykosids, in einem Abstand, der dem zweier benachbarter Schleifen oder Ausbuchtungen einer prä-miRNA entspricht, Selektivität bei der Inhibition generiert werden kann und dies umso mehr je höher die Rigidität des Dimers ist. Die breite Verteilung der ermittelten Inhibitionswerte des initialen Screenings sowie die Beobachtung, dass insbesondere bei dem prä-miRNA-Paar let7/Bantam die Inhibitionswerte bei den gewählten Konzentration von 5 oder 0.5 μM bis zu 100 Prozentpunkte auseinanderliegen können, deuteten an, dass je nach Struktur des bivalenten Aminoglykosids der Reifungsprozess einer miRNA bevorzugt inhibiert werden könnte.

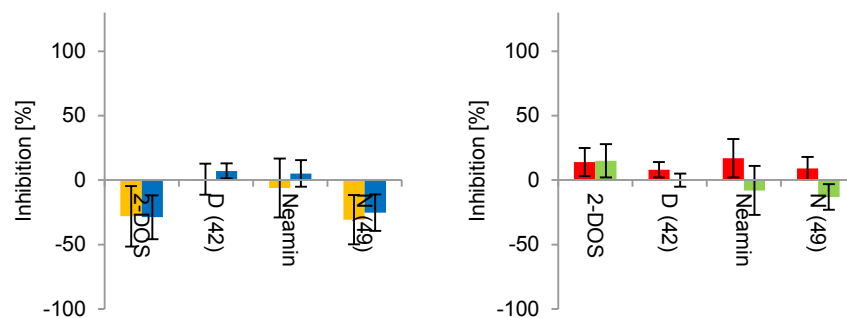


Abb. 4-24 | Inhibition der miRNA-Reifung durch 2-DOS, Neamin, D und N | Konzentrationen: 5 μM für D und 2-DOS, 0.5 μM für Neamin und N, Farblgende: **Prä-Bantam** **Prä-let7** **Prä-miR-21** **Prä-miR 122**.

58 Um die Frage der Selektivität zu klären, wurden für Dimere, die im initialen Screening hohe Inhibitionswerte gezeigt hatten, erneut kompetitive BRCA-Reifungsassays durchgeführt. In diesen wurde die Konzentration der Testverbindungen von 5 auf 1 μM (D und D*) bzw. von 0.5 auf 0.1 μM (N) reduziert. Dies diente dazu, das inhibitorische Potential der selektierten Testsubstanzen besser abzuschätzen, da nur die potentesten Dimere hinsichtlich etwaiger Präferenzen für eine prä-miRNA genauer untersucht werden sollten. Auch in diesem zweiten Screening waren besonders bei der let7/Bantam-Reifung deutlich unterschiedliche Inhibitionswerte abzulesen (Abb. 4-25).

Um eine präzisere Aussage über die Selektivität treffen zu können, sollten für die potentesten Verbindungen IC_{50} -Kurven bestimmt werden. Dafür wurden zunächst für jedes prä-miRNA-Paar Kontrollmessungen für jeweils zwölf Substanzen durchgeführt, anhand derer ausgeschlossen werden sollte, dass die Dimere die enzymatische Amplifikation statt der miRNA-Reifung inhibieren (Abb. 4-26). Dafür wurden die Testsubstanzen erst nach dem Reifungsschritt in entsprechender Verdünnung (let7/Bantam: 5/0.5 μM , miR-21/122: 1/0.1 μM) zugegeben und aus dem Anstieg der Fluoreszenzintensität ein „Inhibitionswert“ berechnet. Die dabei erhaltenen Daten sind in den Balkendiagrammen von Abb. 4-26 vergleichsweise gegenüber den Inhibitionswerten aus den regulären BRCA-Reifungsassays aufgetragen. Aus dieser Darstellung wird deutlich, dass die Einflüsse der potentesten Inhibitoren auf die *Bst*-vermittelte Amplifizierung gering sind, da auch die Inhibitionswerte der BRCA-Kontrollmessungen vernachlässigbar klein sind.

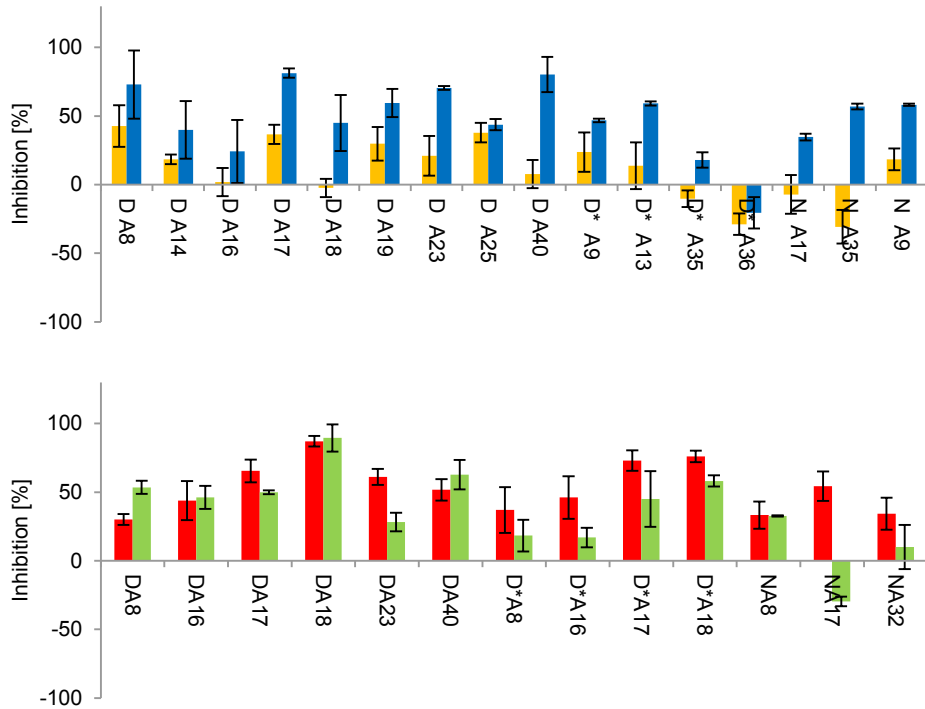


Abb. 4-25 | Inhibitionswerte des BRCA-Reifungsassays bei kleineren Konzentrationen | Konzentrationen: 1 μM für D, D* und 0.1 μM für N, die Inhibitoren D*A8 und D*A18 wurden für prä-let7/Bantam nicht bei kleinerer Konzentration getestet, Farblegende: **Prä-Bantam** **Prä-let7** **Prä-miR-21** **Prä-miR 122**.

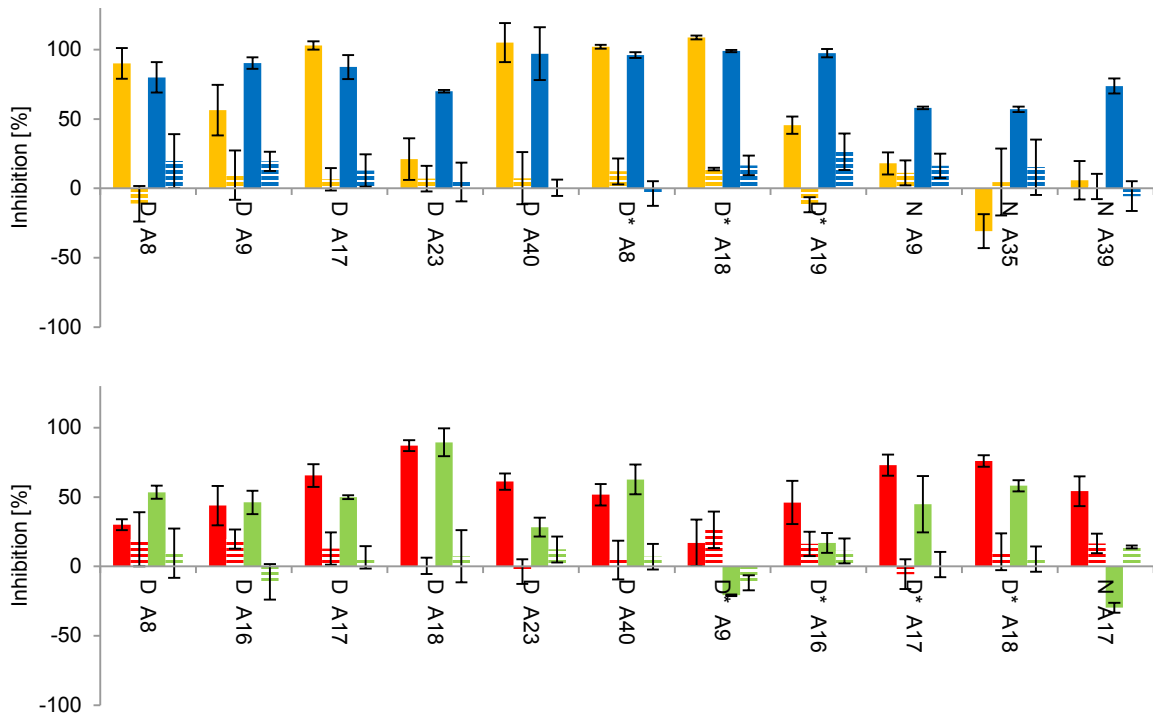


Abb. 4-26 | Inhibitionswerte der BRCA-Kontrollmessungen | Dargestellt sind für jede der getesteten Verbindungen die Inhibitionswerte des BRCA-Reifungsassays (ausgefüllt) und die der BRCA-Kontrollmessungen (horizontal schraffiert), Konzentrationen in den BRCA-Kontrollmessungen: prä-let7/Bantam 5/0.5 μM für D, D*/N; prä-miR-21/21 1/0.1 μM für D, D*/N, Konzentrationen in den BRCA-Reifungsassays: prä-let7/Bantam 5/0.5 μM für D, D*/N; prä-miR-21/122 1/0.1 μM für D, D*/N, Farblegende: **Prä-Bantam** **Prä-let7** **Prä-miR-21** **Prä-miR 122**.

Aus diesen letzten zwölf Inhibitoren wurden schließlich **DA40**, **D*A8**,* **D*A16** und **NA35** für die Bestimmung von IC_{50} -Werten der let7/Bantam-Reifung und **DA40**, **D*A16**, **D*A18** und **NA17** für die IC_{50} -Werte der miR-21/122-Reifung ausgewählt (Tab. 4.2, Abb. 4-27). Diese Verbindungen sind mit IC_{50} -Werten von bis zu $0.6 \mu M$ überaus potente Inhibitoren der miRNA-Reifung. In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen der RNA-Erkennung durch Aminoglykoside, sind die beiden Neamindimere, verbunden durch ein aromatisches Sulfon bzw. ein Fluoren, potenter als die 2-DOS-Dimere. Nur die Verbindung **D*A18**, in der D* über ein *p*-Terphenyl verbrückt ist, weist mit $1 \mu M$ bei der Inhibition der let7-Reifung einen IC_{50} -Wert auf, der in der Größenordnung der besten IC_{50} -Werte von **NA17** ($IC_{50} = 0.6 \mu M$ /miR-21) und **NA35** ($IC_{50} = 0.6 \mu M$ /let7) liegt.

Die Reifung der Prä-Bantam wird in Entsprechung zu den bisherigen Ergebnissen durch alle vier Dimere schlechter inhibiert als die gleichzeitig vorhandene prä-let7. Bei der Verwendung des Inhibitors **NA35** ($IC_{50} = 0.6$ vs. $1.8 \mu M$ für let7 vs. Bantam) ist der Unterschied am größten; bei **DA40** unterscheiden sich die IC_{50} -Werte nur noch um den Faktor zwei. In dieser Größenordnung liegen auch alle anderen IC_{50} -Wert-Verhältnisse, die in den kompetitiven Assays ermittelt wurden. Die ausgewählten Verbindungen sind daher entgegen den Erwartungen, die sich aus dem Screening ergeben haben, nur wenig selektive Inhibitoren der miRNA-Reifung. Diese Diskrepanz kann mithilfe des IC_{50} -Kurvenverlaufs erklärt werden. Da die Kurven meist sehr starke Steigungen aufweisen, ist auch das Konzentrationsfenster, in dem die Inhibition von 100 auf 0 % absinkt, sehr klein. Vergleicht man beispielsweise die Inhibition von **DA40** für das Paar prä-let7/Bantam bei $3 \mu M$ wird die prä-let7-Reifung vollständig und die prä-Bantam-Reifung nur minimal gehemmt. Aber schon bei $1 \mu M$ ist auch die Inhibition der prä-let7-Reifung nahezu Null. Daher wurden im Screening Selektivitäten suggeriert, die sich in den IC_{50} -Werten nicht wiederfinden lassen. Für solide Aussagen hinsichtlich der Selektivität nützen Messungen bei einer einzelnen Konzentration daher wenig. Stattdessen müssen stets die IC_{50} -Werte miteinander verglichen werden. Im Hinblick darauf hat sich bei den hier ausgewählten Substanzen das Konzept der Dimerisierung zur Generierung von Selektivität bei der Inhibition der miRNA-Reifung als wenig effektiv erwiesen.

Tab. 4-2 | Tabellarische Übersicht der IC_{50} -Werte (μM) | Die Bestimmung der IC_{50} -Werte erfolgte mit der Software *GraphPad Prism 6.0*, in Klammern sind die 95 %-Vertrauensintervalle angegeben. In den Fällen, in denen kein definiertes Vertrauensintervall errechnet werden konnte, wurde der Konzentrationsbereich zwischen den gemessenen Inhibitionsdaten angegeben, die den IC_{50} -Wert umschließen.

Prä-miRNA	DA40	D*A8	D*A16	D*A18	NA17	NA35
Prä-Bantam	3.3 (1.8-6.0)	4.4 (2.5-5.0)	–	1.5 (0.9-2.4)	–	1.8 (1.0-2.0)
Prä-let7	1.5 (1.3-1.6)	2.4 (1.0-2.5)	–	1.0 (1.0-2.5)	–	0.6 (0.4-0.1)
Prä-miR-21	1.8 (1.3-2.4)	–	9.0 (2.5-10)	1.3 (1.1-1.5)	0.6 (0.3-1.0)	–
Prä-miR-122	2.7 (2.5-5.0)	–	8.7 (2.5-10)	2.0 (1.3-3.0)	1.2 (0.8-1.6)	–

* D*A8 und D*A18 wurden zuvor nicht bei kleinerer Konzentration getestet.

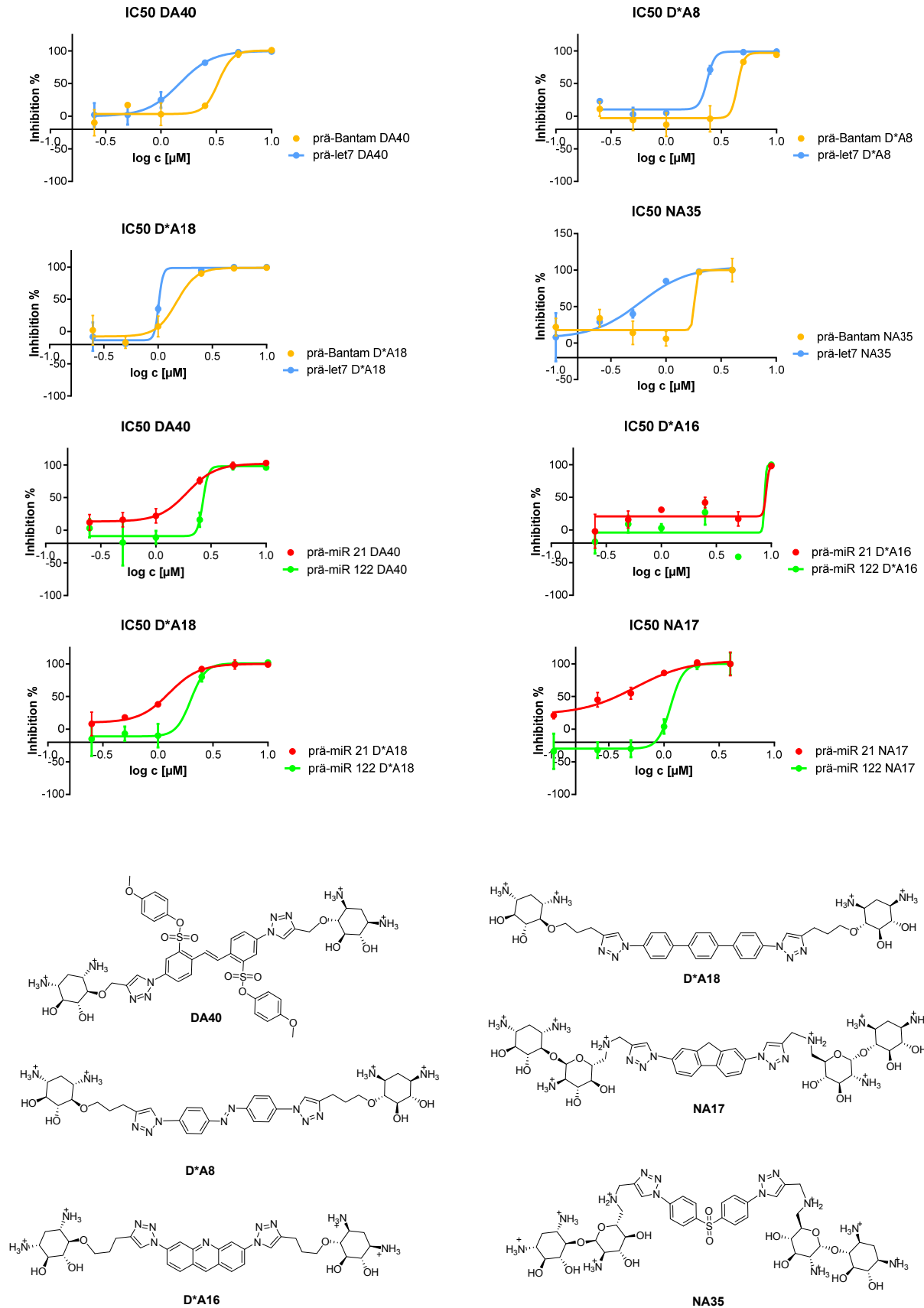


Abb. 4-27 | IC₅₀-Kurven und Strukturen ausgewählter Verbindungen | Die Inhibitionswerte wurden bei sechs verschiedenen Konzentrationen bestimmt und gegen die Logarithmen der Konzentrationswerte aufgetragen. Die IC₅₀-Kurven wurden mit der Software *GraphPad Prism 6.0* ermittelt.

4-3 | Synthesen von Alkin-modifizierten Ribonukleotiden

Der im Arbeitskreis Arenz entwickelte BRCA-Assay ist ein effizientes Instrument, um Substanzbibliotheken nach Inhibitoren der miRNA-Reifung zu durchsuchen und um Fragen bezüglich Potenz und Selektivität der Testverbindungen mit vertretbarem Aufwand zu klären.^[110] Neben einer solchen Modellierung des *Dicer*-vermittelten Reifungsschritts *in vitro*, ist aber auch die Bildgebung und Detektion der miRNA-Reifung *in cellulo* von großem Interesse. In Anlehnung an den von Davies *et al.* etablierten fluoreszenzbasierten Reifungsassay, könnten dafür beispielsweise fluoreszenzmarkierte prä-miRNA-Sonden eingesetzt werden (vgl. Kap. 2-8).^[63b] Aufgrund der Haarnadelstruktur von prä-miRNAs, wird in diesen Sonden die Fluoreszenz eines 5'-terminalen Fluorophors (5/6-Carboxyfluorescein, FAM) durch die Nähe zum 3'-terminalen Fluoreszenzlöcher (Dabcyl, DAB) gelöscht. Erst die Spaltung der prä-miRNA-Sonde durch *Dicer* ermöglicht eine räumliche Trennung und kann über den Anstieg der Fluoreszenzintensität ausgelesen werden. Um diese Sonden herzustellen, wurden sie bislang retrosynthetisch in zwei ca. 30 nt-lange Teile zerlegt. Sowohl das FAM- als auch das DAB-markierte RNA-Oligonukleotid wurden dann durch Festphasensynthese aufgebaut und abschließend ligiert.^[109] Durch die bekannten Nachteile der RNA-Festphasensynthese, wie z. B. geringe Kupplungsausbeuten und Nebenreaktionen, die eine Reinigung der abgespaltenen RNA erschweren, ist dieses Verfahren insgesamt sehr kostenintensiv. Daher sollte untersucht werden, ob die CuAAC-basierte Funktionalisierung enzymatisch synthetisierter RNA-Oligonukleotide eine Alternative sein kann. Da das Spektrum an kommerziell verfügbaren Azid-funktionalisierten Fluorophoren und Fluoreszenzlöchern sehr breit ist, könnte man diese Strategie auch dafür nutzen, Sonden nach dem Baukastenprinzip mit anderen Fluoreszenzeigenschaften auszustatten.

Der zweite Schwerpunkt dieser Dissertation lag daher auf der Entwicklung einer Syntheseroute für ein Alkin-modifiziertes Ribonukleotid, das durch CuAAC mit Azid-modifiziertem DAB verknüpft und anschließend durch *in-vitro*-Transkription gezielt am 5'-Ende der prä-miRNA eingebaut werden kann. Um den Fluorophor am 3'-Ende einführen zu können, sollte des Weiteren der synthetische Zugang zu einem Alkin-funktionalisierten Ribonukleotid ausgearbeitet werden, das sich mit einem Azid-tragenden FAM konjugieren lässt. Dieser Baustein musste zudem die strukturellen Voraussetzungen erfüllen, um durch enzymatische Ligation an das 3'-Ende der prä-miRNA eingeführt werden zu können. Grundsätzlich ist die 3'- bzw. 5'-terminale Positionierung von FAM und DAB beliebig. Die hier gewählte Reihenfolge zielte darauf ab, im Fall einer unvollständigen Ligation am 3'-Ende eine möglichst geringe Hintergrundfluoreszenz durch nur partiell gelöschte FAM-Sonden zu erzeugen.

4-3.1 | Synthese eines Alkin-modifizierten *T4 RNA Ligase 1* Substrats

Für die Ligation eines modifizierten RNA-Bausteins an das 3'-Ende der prä-miRNA sollte die *T4 RNA Ligase 1* verwendet werden, die unabhängig von einem Templat die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 3'-Hydroxyl-RNA-Oligonukleotid und einem Mononukleosid-3',5'-*O,O*-bisphosphat katalysiert (vgl. Kap. 2-9).^[114a, 114b] Die Phosphorylierung an der 3'-Hydroxylfunktion erfüllt dabei den Zweck, eine wiederholte Ligation und damit unkontrollierbare Verlängerung zu verhindern.

Da die *T4 RNA Ligase 1* bisphosphoryliertes Cytidin (pCp) als Substrat bevorzugt, sollte Cytidin **53** Ausgangspunkt der Synthese eines ligierbaren Nukleotids sein.^[114b] Die leicht zugänglichen Hydroxylfunktionen des Riboserings schieden hinsichtlich einer Alkinmodifizierung aus, da die Positionen 3'- und 5'-OH phosphoryliert werden und die 2'-OH-Funktion als charakteristisches RNA-Merkmal erhalten bleiben sollte. Zunächst wurde daher versucht, **53** durch eine Bisulfit-katalysierte Transaminierung am *N4* und anschließende Behandlung mit Pyrophosphorylchlorid zum gewünschten alkinylierten Bisphosphat **55** umzusetzen (Abb. 4-28). Diese Reihenfolge ist wichtig, da Transaminierungen an Nukleotiden durch die höhere negative Ladungsdichte langsamer ablaufen als an entsprechenden Nukleosiden.^[149] Auch der pH-Wert ist ein kritischer Parameter. Die Reaktion verläuft in dem pH-Bereich 7.2 bis 7.4 am schnellsten, schon ein pH > 7.5 verlangsamt die Reaktion; bei einem pH < 5 dominiert die Deaminierung zum Uridin **52**.^[150] Mit dieser Methode konnten allerdings nur sehr geringe Mengen an **54** (Ausbeuten i.d.R. < 2 %) isoliert werden, die im weiteren Verlauf bei 0 °C in Abwesenheit von Lösungsmitteln mit 15 Äq. Pyrophosphorylchlorid umgesetzt wurden. Diese Reaktion ist nicht selektiv und kann zu einem Gemisch an phosphorylierten Produkten führen. Jedoch wurde unter den gewählten Bedingungen eine Begünstigung für die zweifache Phosphorylierung unter Bildung von 3',5' und 2',5'-*O,O*-Bisphosphaten beschrieben.^[114a] Letztere Verbindung ist weder Substrat noch Inhibitor der *T4 RNA Ligase 1*. Es gelang aber weder die gewünschte Zielverbindung **55** aus dem schwarz verfärbten Reaktionsgemisch mittels DC zu identifizieren noch sie zu isolieren..

63

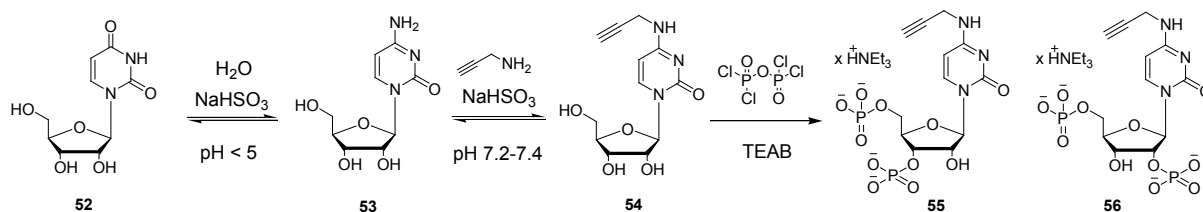


Abb. 4-28 | Synthesevorschlag für *N4*-propargyliertes pCp

Ein Ausweichen auf die mildere Phosphoramidit-Variante nach Amidkupplung einer Alkinsäure schien zweckmäßig (Abb. 4-29). Dazu wurde **53** in Gegenwart von 1 Äq. Pentinsäure und jeweils 1.5 Äq. HOBt sowie dem wasserlöslichen Carbodiimid EDC zum *N4*-Alkin-funktionalisierten **57** umgesetzt. Die hohe Polarität von **57** ließ die Reinigung

durch eine Säulenchromatografie nicht zu. Stattdessen wurde das Produkt **57** in MeOH gelöst und durch Zutropfen von CH_2Cl_2 gefällt. Die anschließende Silyl-basierte Schutzgruppenstrategie sollte die selektive Darstellung eines 3',5'-*O,O*-Bisphosphats ermöglichen. Um die 3',5'- und die 2'-Hydroxylfunktionen unterscheidbar zu machen, wurde **57** zuerst mit 1.1 Äq. Di-*tert*-butylsilyl-bis(trifluormethansulfonat) in Anwesenheit von NEt_3 behandelt. Nach säulenchromatografischer Reinigung über Kieselgel wurde durch Verwendung von 1.3 Äq. TBDMS-Cl und 2.6 Äq. Imidazol die 2'-Hydroxylfunktion silyliert.^[151] Die selektive Abspaltung der 3',5'-*O,O*-Schutzgruppe gelang quantitativ durch Behandlung von **58** mit einem $\text{HF} \times \text{Pyridin}$ -Komplex in THF bei 0 °C. Die Phosphoramidite wurden danach 1*H*-Tetrazol-vermittelt eingeführt, mithilfe von *tert*-Butylhydroperoxid oxidiert und Nebenprodukte durch Säulenchromatografie über Kieselgel abgetrennt. Das für diese Reaktion benötigte Bis(2-cyanoethyl)-*N,N*-Diisopropylphosphoramidit **63** wurde in zufriedenstellender Ausbeute (59 %), ausgehend von *N,N*-Diisopropylphosphoramiditchlorid, und 3-Hydroxypropionitril, synthetisiert.^[152] Die säulenchromatografische Reinigung über Kieselgel erfolgte unter Schutzgasatmosphäre mit einem Laufmittelgemisch aus NEt_3 in Cyclohexan.

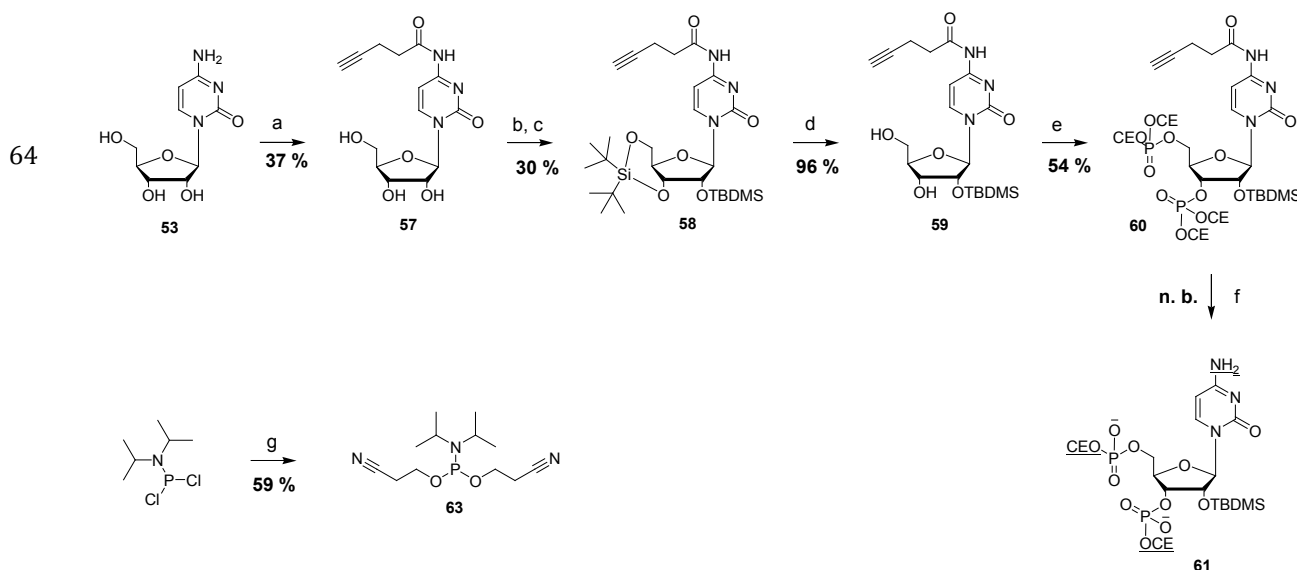


Abb. 4-29 | Synthesevorschlag für N4-alkinyliertes pCp | a Pentinsäure, EDC \times HCl, HOBT, Pyridin | b $(t\text{Bu})_2\text{Si}(\text{OTf})_2$, NEt_3 , DMF | c TBDMS-Cl, Imidazol, DMF | d $\text{HF} \times \text{Pyridin}$, THF | e $\text{P}^{\text{III}}(\text{OCE})_2(\text{N}^i\text{Pr}_2)$ **63**, 1*H*-Tetrazol, DCM, $t\text{BuOOH}$ | f 7 N NH_3 in MeOH, 50 °C | g DIPEA, 3-Hydroxypropionitril, THF.

Die abschließende Entfernung der vier Cyanoethylschutzgruppen (CE) mit ammoniakalischem MeOH war problembehaftet. Trotz Erhitzen der Reaktionslösung auf bis zu 50 °C, blieben mindestens zwei der CE-Schutzgruppen erhalten. Die Ursache liegt vermutlich in der mit jeder β -H-Eliminierung ansteigenden negativen Ladungsdichte an den Phosphatestern, die eine erneute Deprotonierung erschweren. Zudem wurde unter diesen Bedingungen das exocyclische Pentinylamid hydrolysiert. Dies wurde selbst dann beobachtet, wenn die Reaktion bei RT durchgeführt wurde. Ein alternatives Protokoll

für die Entfernung von CE-Schutzgruppen sieht die Verwendung von nicht-nukleophilen Basen und silyliertem Acetamid vor. Dabei wird der Cyanoethylrest nach Eliminierung *in situ* gegen eine Trimethylsilylgruppe substituiert und diese anschließend durch wässrige Aufarbeitung hydrolysiert.^[153] Die Reagenzienkombination aus *N,O*-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA), DBU und Pyridin führte zwar zu einer quantitativen Abspaltung der Cyanoethylschutzgruppen, jedoch wurde auch unter diesen Bedingungen das Amid hydrolysiert. Ein Wechsel der Schutzgruppenstrategie auf säurelabile *tert*-Butylgruppen konnte dieses Problem nicht lösen: Nach Behandlung des *tert*-Butyl-cytidinbisphosphats mit 15 % TFA in CH₂Cl₂ wurde ein Produktgemisch aus alkinyliertem und nicht-alkinyliertem Cytidinbisphosphat erhalten, das trotz säulenchromatografischer Reinigung an drei verschiedenen stationären Phasen (RP₁₈-modifiziertes Kieselgel, DEAE-Cellulose, DEAE-Sephadex®) nicht getrennt werden konnte. Die Probleme bei der Synthese des Alkin-modifizierten Cytidinbisphosphats erforderten eine Umstrukturierung des Synthesekonzepts. Hinsichtlich der Substratspezifität der *T4 RNA Ligase 1* folgt dem pCp das bisphosphorylierte Uridin (pUp), dessen Nukleobase z. B. an der C5-Position durch ein Alkin modifiziert werden kann.^[154] Daher wurde ein Syntheseplan für die Herstellung von 3',5'-*O,O*-Bisphosphat-5-ethinyluridin **72** (pUp^{Alk}) ausgearbeitet.

Die Synthese des Schlüssel-Intermediats **68** (Abb. 4-30) gelang mit sehr guten Ausbeuten ausgehend von *ribo*-Uridin **64**. Dazu wurden zunächst alle Hydroxylgruppen von **64** Acetyl-geschützt und die Nukleobase anschließend durch Verwendung von (NH₄)₂Ce(NO₃)₆ und I₂ bei 80 °C an der C5-Position iodiert.^[155] Dieser Schritt sollte nachfolgend die Kupplung mit Trimethylsilylacetylen unter Sonogashira-Bedingungen ermöglichen. Die Umsetzung von **66** bei RT mit den Reagenzien NEt₃, CuI und PdCl₂(PPh₃)₂ und DMF als Lösemittel gelang mit guter Ausbeute (77 %).^[156] Wurde hingegen Pd(PPh₃)₄ als Palladiumspezies eingesetzt und die Reaktionslösung bei 50 °C gerührt, konnte das gewünschte Produkt nur mit einer Ausbeute von 39 % isoliert werden.^[157] Anschließend wurden die TMS- sowie Acetylschutzgruppen in **67** durch sukzessive Behandlung mit TBAF und NaOH in EtOH entfernt. Für eine selektive 3',5'-*O,O*-Bisphosphorylierung wurde die gleiche Schutzgruppenstrategie wie beim entsprechenden Cytidin-derivat angewandt. Dazu wurde **68** in einer Eintopfreaktion bei 0 °C konsekutiv mit ^tBu₂Si(OTf)₂ und TBDMS-Cl in Anwesenheit von Imidazol umgesetzt.^[158] Der cyclische Silylether in **69** konnte anschließend selektiv und mit hervorragender Ausbeute durch HF × Pyridin entfernt werden. Anschließend wurde das Phosphoramidit **63** 1*H*-Tetrazolvermittelt eingeführt und mit *tert*-Butylhydroperoxid oxidiert (69 %).

65

Auf den Erfahrungen am Cytidin-Nukleotid aufbauend wurden für die Entfernung der Cyanoethylschutzgruppen *N,O*-Bis(trimethylsilyl)acetamid (BSA) und DBU eingesetzt. Mittels DC-Kontrolle wurde nach 5 h eine quantitative CE-Abspaltung beobachtet und das Rohprodukt ohne weitere Reinigungsschritte durch abwechselnde Koevaporation

mit Pyridin und Toluol getrocknet. Um die 2'-*O*-Silylschutzgruppe zu entfernen, wurde das getrocknete Zwischenprodukt mit unverdünntem $\text{NEt}_3 \times 3\text{HF}$ statt TBAF in THF behandelt. Löslichkeitsprobleme, die durch NBu_4^+ bei der anschließenden enzymatischen Ligation im wässrigen Medium auftreten könnten, sollten so vermieden werden. Das Rohprodukt wurde nach Zugabe von TEAB-Puffer (pH 7.5) säulenchromatografisch über DEAE-Sephadex® mit TEAB-Puffer (pH 7.5) als Laufmittel gereinigt. Diese achtstufige Synthesesequenz lieferte die Zielverbindung **71** in Form eines Triethylammoniumsalzes mit einer Gesamtausbeute von 21 %.

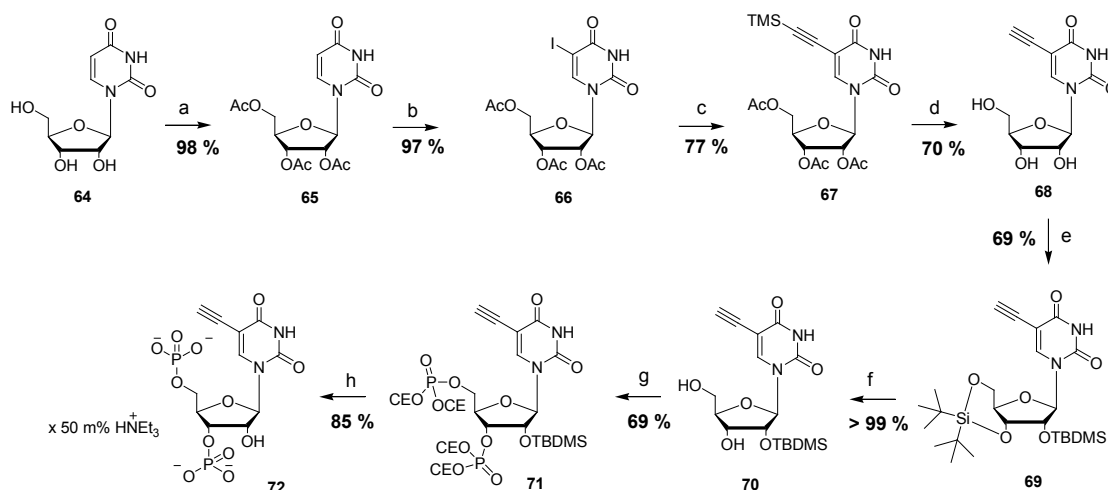


Abb. 4-30 | Synthese von 3',5'-*O,O*-Bisphosphat-5-ethynyluridin pUp^{Alk} | **a** Ac_2O , 1,4-Dioxan | **b** $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$, I_2 , MeCN, 80 °C | **c** NEt_3 , CuI, $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$, DMF | **d1** TBAF, MeCN – **d2** EtOH, NaOH | **e** $t\text{Bu}_2\text{Si}(\text{OTf})_2$ und TBDMS-Cl, Imidazol | **f** $\text{HF} \times \text{Pyridin}$, THF | **g** $\text{P}^{\text{III}}(\text{OCE})_2(\text{N}^i\text{Pr}_2)$ **63**, 1*H*-Tetrazol, DCM, $t\text{BuOOH}$ | **h** BSA, DBU, Pyridin.

Das Alkin-funktionalisierte Nukleotid pUp^{Alk} sollte anschließend durch CuAAC mit FAM konjugiert werden. Für eine kupferkatalysierte Cycloaddition einerseits und eine Amidkupplung mit dem Carboxyl-funktionalisierten Fluorophor andererseits, wurde der bisfunktionalisierte Linker **74** hergestellt (Abb. 4-31). Dafür wurde das Bischlorid **73** durch nukleophile Substitution mit NaN_3 in ein Bisazid und dieses dann durch eine Staudinger-Reduktion zum 2-(2-Aminoethoxy)ethoxyethanazid überführt. 5/6-Carboxyfluorescein wurde durch einen *in situ* generierten NHS-Ester in Gegenwart von *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid und DMF/Borat-Puffer (pH 8.5) als Lösungsmittel mit **73** konjugiert. Nach einer doppelten säulenchromatografischen Reinigung über Kieselgel und RP_{18} -modifiziertem Kieselgel wurde **75** (**FAM- N_3**) mit einer Ausbeute von 42 % in Form eines orangenen Feststoffs erhalten.

Für die Synthese von pUp^{FAM} mittels CuAAC wurden pUp^{Alk} , **FAM- N_3** und der Kupferstabilisierende Ligand THPTA in einem Lösungsmittelgemisch aus DMSO und H_2O gelöst und mit 24 Äq. NaAsc sowie 7.5 Äq. $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ versetzt. Die isolierte Menge des 5/6-Regioisomers pUp^{FAM} nach Reinigung an RP_{18} -modifiziertem Kieselgel war für eine NMR-Analyse zu gering, aber die Ergebnisse der HRMS- und HPLC-MS-Analyse können die Identität und Reinheit von pUp^{FAM} belegen.

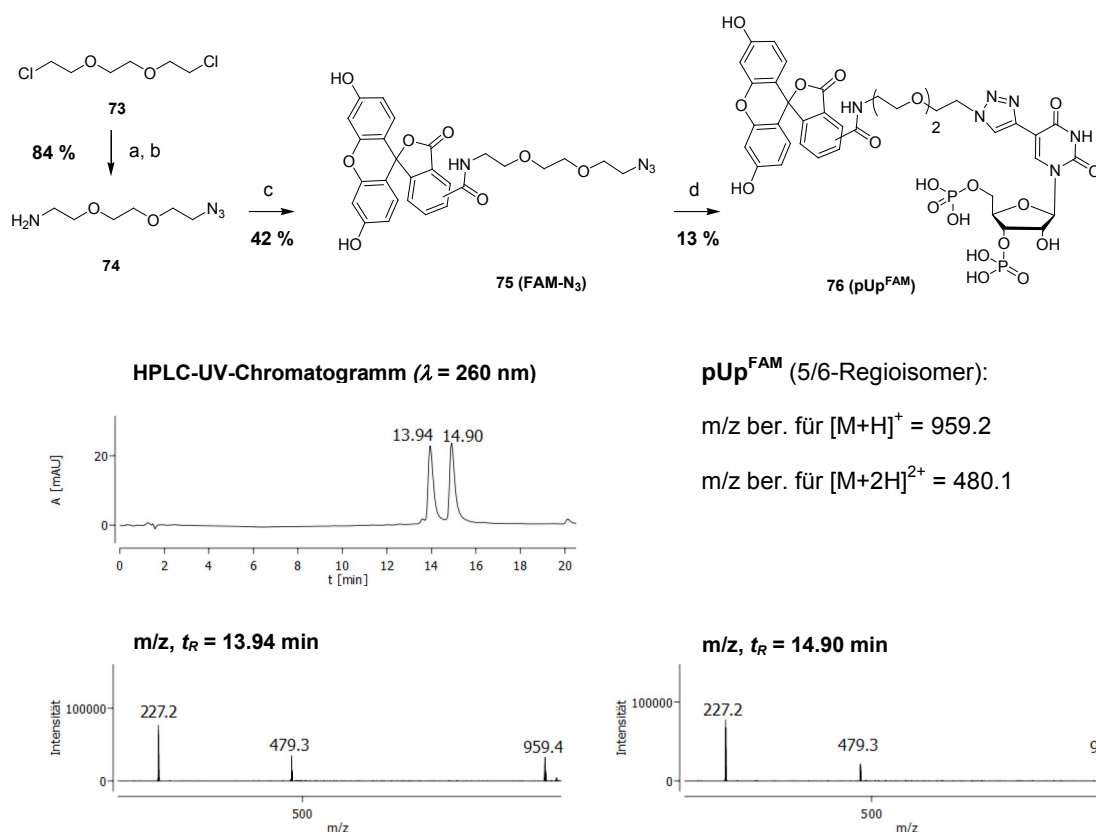


Abb. 4-31 | Synthese von pUp^{FAM} | **a** NaN₃, Dicyclohexyl-18-Krone-6, DMF | **b** PPh₃, Et₂O/THF/1M HCl 1:1:0.1 v/v/v | **c1** 5/6-Carboxyfluorecein, NHS, DIC – **c2** DMF/Boratpuffer (pH 8.5), **74** | **d** pUp^{Alk}, CuSO₄ × 5H₂O, NaAsc, THPTA, DMSO; unten: HPLC-UV/MS-Analyse (Gradient 0→50 % B in A in 20 min) für pUp^{FAM}.

67

4-3.2 | Synthese eines Transkriptionsstarters für die *in-vitro*-Transkription

Um gezielt das 5'-Ende der prä-miRNA zu modifizieren, sollte ein Transkriptionsstarter synthetisiert werden, der durch *in-vitro*-Transkription eines DNA-Templats als erstes Nukleotid in den 5'→3'-wachsenden RNA-Strang inkorporiert wird. Besonders geeignet für den Einbau solcher Initiatoren ist die T7-RNA-Polymerase, da sie unter den bekannten Polymerasen eine besonders hohe Substrattoleranz zeigt.^[115] In diesem Zusammenhang ist bei der Syntheseplanung des Transkriptionsstarters zu berücksichtigen, dass die meisten der kommerziell erwerblichen T7-RNA-Polymerasen sog. Klasse-III-Promotoren besitzen, die eine markante Präferenz für Guanosenin an der Initiationsstelle aufweisen.^[113a, 115] Ziel war es daher ein „Monophosphat“ herzustellen, das einerseits für eine effektive Transkription einen O-5'-Guanosinrest und andererseits, in Vorbereitung auf die CuAAC, einen O-Propargylrest trägt (**GMP^{Prg}**, Abb. 4-32).

Um dieses Ziel zu erreichen, sollte wieder die Phosphoramiditchemie zum Einsatz kommen. Dafür wurde ein propargyliertes Phosphoramidit benötigt, das im Anschluss an ein entsprechend geschütztes Guanosenin gekuppelt werden kann (Abb. 4-32). Um eine solche P^{III}-Verbindung herzustellen, gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten: Entweder eine säurevermittelte Substitution von P^{III}(OCE)(NⁱPr₂)₂ **77** mit Propargylalkohol oder eine basenvermittelte Substitution von P^{III}(NⁱPr₂)Cl₂ mit Propargylalkohol und 3-Hydroxy-

propionitril. In beiden Varianten wurden die Reaktion unter Schlenkbedingungen durchgeführt und anschließend NMR-spektroskopisch untersucht. Das ^{31}P -NMR-Spektrum zeigte ausschließlich ein Signal bei 20 ppm, was auf eine P^{V} -Spezies hinwies.^[159] Zudem wurden in den ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren Signale beobachtet, welche der Diisopropylamin- bzw. Cyanoethylgruppe zugeordnet werden können. Die Signale der Propargylgruppe fehlten jedoch. Stattdessen wurden im ^1H -NMR-Spektrum zwei Signale für Alkenprotonen mit den Integralwerten eins und zwei und im ^{13}C -NMR-Spektrum ein Signal bei 213 ppm erfasst. Das m/z -Verhältnis der ESI-HRMS-Analyse stimmte mit dem theoretisch berechneten Wert für **78** überein.

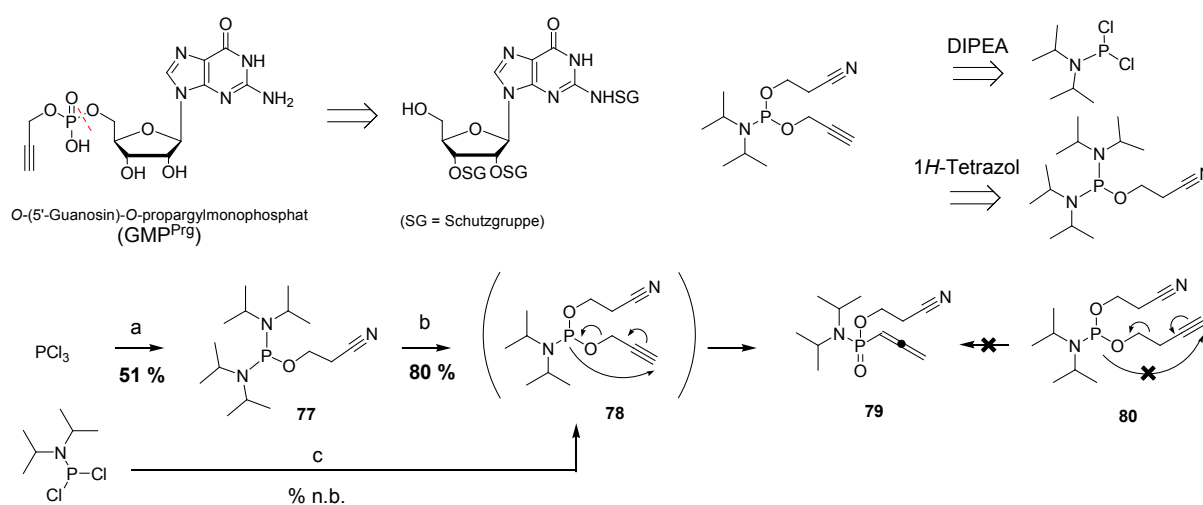


Abb. 4-32 | Retrosynthese A von GMP^{Prg} und Umlagerung zum allenylischen Phosphonat | a DIPEA, 3-Hydroxypropionitril, MeCN | b 1H-Tetrazol, Propargylalkohol, CH_2Cl_2 | c DIPEA, Propargylalkohol, 3-Hydroxypropionitril, THF.

Die Zusammenfassung dieser Analysen deutete stark auf die Bildung des intramolekularen Umlagerungsprodukts **79** hin. Tatsächlich ergab eine strukturbasierte Literatursuche, dass die Bildung solcher allenylischen Phosphonate bereits 1962/63 von zwei Forschergruppen unabhängigen voneinander publiziert wurde.^[160] Das Einführen einer TMS-Schutzgruppe an der terminalen Alkinfunktion kann eine Möglichkeit sein, diese Umlagerung zu vermeiden. Unter der Annahme des gezeigten Mechanismus würde aber auch die Verlängerung um eine Methyleinheit (z. B. **80**) diesen Reaktionsweg wirksam blockieren, da in diesem Fall der Energiegewinn der $\text{P}^{\text{III}} \rightarrow \text{P}^{\text{V}}$ -Transformation fehlen würde. In diesem Kontext wurde vor kurzem über die Synthese eines entsprechenden Pentinolderivats berichtet.^[161]

In einem alternativen retrosynthetischen Ansatz könnte man *O*-(5'-Guanosin)-*O*-propargylmonophosphat auch so zerlegen, dass das Phosphoramidit mit dem Guanosinrest derivatisiert ist (Abb. 4-33). Der daran zu kuppelnde Propargylrest müsste den Ergebnissen aus dem vorangegangenen Abschnitt zufolge an der Alkinfunktion TMS-geschützt sein. Diese Variante wurde zeitgleich zur Synthese aus Abb. 4-32 erprobt und führte ohne Komplikationen zum gewünschten Produkt GMP^{Prg} . Ausgangspunkt war Guanosinmonohydrat **81**, dessen 2',3'-Hydoxyl- sowie exocyclische Aminofunktion im ersten

Schritt Acetonid- bzw. Amidin-geschützt wurden (57 %). Anschließend wurde **82** in Gegenwart von 1*H*-Tetrazol mit $P^{III}(OCE)(N^iPr_2)_2$ **77** umgesetzt. Nach einer Stunde wurde der TMS-geschützte Propargylalkohol sowie ein weiteres Aliquot an 1*H*-Tetrazol zugegeben und die Reaktion nach einer weiteren Stunde durch Zugabe von *tert*-Butylhydroperoxid gestoppt. Das Zwischenprodukt **83** wurde mittels Säulenchromatografie über Kieselgel von den Nebenprodukten abgetrennt und zur Abspaltung der basenlabilen Schutzgruppen mit ammoniakalischem MeOH behandelt. Das Acetonid wurde durch Zugabe von wässriger TFA entfernt.

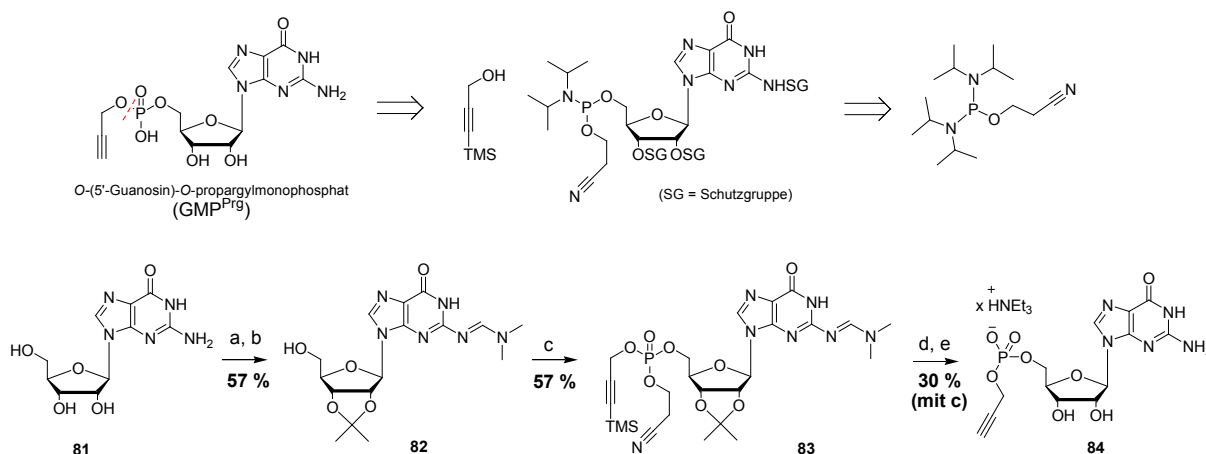


Abb. 4-33 | Retrosynthese B von GMP^{Prg} und dessen Umsetzung | a Aceton, HClO₄ | **b** *N,N*-Dimethylformamiddimethylacetal, DMF | **c1** $P^{III}(OCE)(N^iPr_2)_2$ **77**, 1*H*-Tetrazol, CH₂Cl₂ **c2** 1*H*-Tetrazol, 3-Trimethylsilylpropargylalkohol **c3** *t*BuOOH | **d** 7*N* NH₃ in MeOH | **e** TFA/H₂O 1:1, TEAB-Puffer.

69

Die Reinigung der polaren Zielverbindung **GMP^{Prg} 84** gelang durch Säulenchromatografie über DEAE-Cellulose mit TEAB-Puffer (pH 7.7) als mobile Phase. Die Bemühungen, überschüssiges NEt₃ durch wiederholtes Entgasen mit Argon und mehrmaliger Gefrier-trocknung zu entfernen, blieben erfolglos. Daher wurde der Anteil an NEt₃ durch Integralauswertung des ¹H-NMR-Spektrums abgeschätzt und bei der Berechnung der Ausbeute (mit c, d, e: 30 %) berücksichtigt. Die ³¹P-NMR-Analyse von **84** zeigte ein P^V-typisches Signal bei 0.5 ppm und die im ¹³C-NMR-Spektrum zu erwartende Dublett-Aufspaltung der Signale von Kohlenstoffatomen, die sich in unmittelbarer Umgebung des Phosphors befinden, belegten zudem die erfolgreiche Bildung des Phosphodiesters mit einem *O*-Propargyl sowie 5'-*O*-Guanosylrest.^[162] Als Gesamtausbeute für die Synthese von **GMP^{Prg}** ergibt sich ein Wert von 17 %.

Dieses Nukleotid sollte dazu dienen das 5'-Ende der prä-miRNAs mit DAB zu markieren. Für die Einführung des Aminoazidlinkers **74** in den Fluoreszenzlöcher 4-(4-Dimethylaminophenylazo)benzoesäure, wurde auf HOBt, EDC × HCl sowie DIPEA zurückgegriffen. Das Rohprodukt wurde durch Säulenchromatografie über Kieselgel und Fällen aus Cyclohexan/EtOAc gereinigt und lieferte die Zielverbindung **86 (DAB-N₃)** in Form eines roten Feststoffs. Anschließend wurde **DAB-N₃** mit dem Transkriptionsstarter **GMP^{Prg}** unter den gleichen Reaktionsbedingungen wie bei der CuAAC mit **pUp^{Alk}** zum **GMP^{DAB}** umgesetzt. Nach Reinigung durch Säulenchromatografie über RP₁₈-modifiziertes Kiesel-

gel mit einem MeCN/H₂O-Laufmittelgemisch wurde die gewünschte Verbindung **GMP^{DAB}** als roter Feststoff isoliert. Die Resultate der ¹H-, ¹³C-, ³¹P-NMR-Spektroskopie sowie der HRMS- und HPLC-UV/MS-Analysen konnten die Identität und Reinheit belegen.

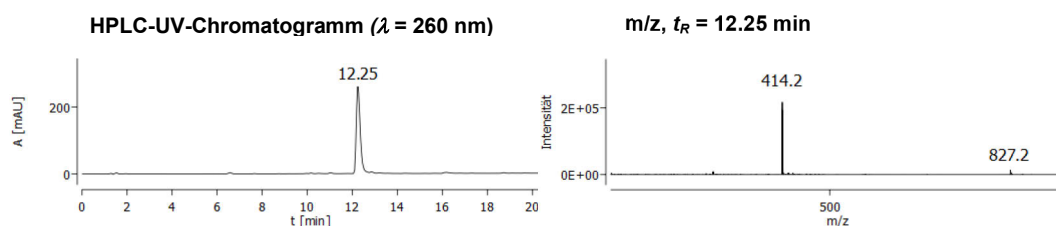
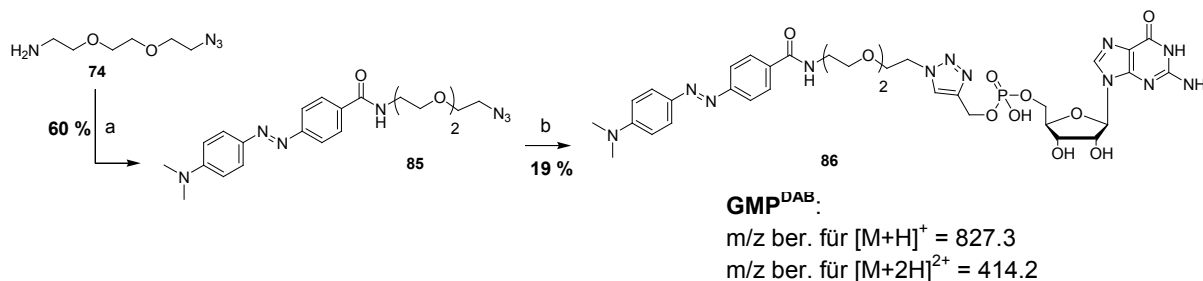


Abb. 4-34 | Synthese von GMP^{DAB} | **a** DabcyI, EDC \times HCl, HOBT, DIPEA | **b** **72**, CuSO₄ \times 5H₂O, NaAsc, THPTA, DMSO; unten: HPLC-UV/MS-Analyse (Gradient 3 \rightarrow 90 % B in A in 20 min) für **GMP^{DAB}**.

4-4 | Chemo-enzymatische Modifizierung von prä-miRNAs

Mit den hergestellten Nukleotiden **pUp^{FAM}** und **GMP^{DAB}** sollten prä-let7, prä-miR-142, -21 und -122 modifiziert werden (Abb. 4-35). Der mit DAB markierte Transkriptionsstarter **GMP^{DAB}** sollte durch *in-vitro*-Transkription an das 5'-Ende der prä-miRNAs (**DABprä-miR**) eingeführt und deren 3'-Enden anschließend durch Ligation mit **pUp^{FAM}** verlängert werden (**DABprä-miR^{FAM}**). Dieser Ansatz setzte eine entsprechende Substrattoleranz der T7-RNA-Polymerase sowie der T4 RNA Ligase 1 voraus. Beide Enzyme wurden von kommerziellen Anbietern bezogen. Die von ihnen zur Verfügung gestellten Standard-Protokolle wurden zunächst am Beispiel der prä-miR-142 für die Einführung modifizierter Nukleotide adaptiert und optimiert.

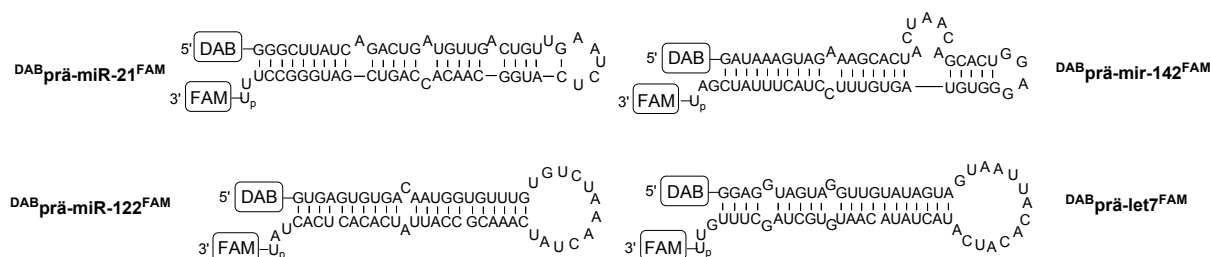


Abb. 4-35 | Sekundärstrukturen synthetisierter DABprä-miR^{FAM}-Sonden, modelliert mit Mfold

Für die *in-vitro*-Transkriptionen wurde das Kit *RiboMAX™ Large Scale RNA Production T7* verwendet. Um den doppelsträngigen Promotor zu generieren wurden das DNA-Templat für die prä-miR-142 und der T7-Promotor für 2 min auf 95 °C erhitzt und

langsam abgekühlt. Dann wurde die wässrige Lösung mit äquimolaren Mengen GTP, ATP, UTP und CTP sowie einem achtfachen Überschuss an **GMP^{DAB}** (gelöst in DMSO) versetzt. Dabei wurde die Bildung eines roten Niederschlags beobachtet. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurde die Transkription durch Zugabe von *DNase* gestoppt und die Enzyme mit einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion (PCI-Extraktion) entfernt. Die RNA wurde durch Zugabe von kaltem EtOH gefällt. Eine Analyse mittels UHPLC/UV-VIS/MS* zeigte jedoch, dass ausschließlich das unmodifizierte prä-miR-142-Transkript entstanden war.

Das Verhältnis **GMP^{DAB}**:GTP ist bei *in-vitro*-Transkriptionen ein entscheidender Parameter. Einerseits konkurriert GTP bei der Initiation der Transkription mit **GMP^{DAB}** um den Einbau und sollte daher nur substöchiometrisch vorhanden sein, andererseits darf die Konzentration von GTP nicht zu stark reduziert werden, da dies sonst zu Transkriptionsabbrüchen führt. Die optimale Zusammensetzung des Nukleotidgemisches kann je nach RNA-Sequenz oder Natur des Transkriptionsstarters stark variieren.^[163] In diesem Zusammenhang wurde über das sog. Zulaufverfahren (*Fed-Batch*-Prozess) berichtet, in dem die Konzentrationen freier Ribonukleotide durch stete Zufuhr konstant gehalten werden.^[164] Diese Methode schien am ehesten geeignet, um eine maximale Einbaurate des **GMP^{DAB}** zu ermöglichen. Deshalb wurde zu Beginn der Transkription ein (A/C/U)TP:GTP:**GMP^{DAB}** Konzentrationsverhältnis von (7.5:0.75:6.75) mM eingestellt und dann acht Mal alle 15 min 0.84 mM GTP zugegeben. Im Transkriptionsansatz wurde allerdings wie bereits zuvor ein rotes Präzipitat beobachtet, auch wenn die Reihenfolge der Zugabe der einzelnen Reagenzien wie z. B. Puffer, rNTPs oder **GMP^{DAB}** verändert wurde. In keinem dieser Transkriptionsansätze konnte mittels UHPLC/UV-VIS/MS **DABprä-miR-142** detektiert werden. **GMP^{DAB}** war unter den gewählten Bedingungen scheinbar nicht ausreichend löslich und wurde vermutlich deshalb nicht in das Transkript inkorporiert. Es lag daher nahe das wasserlösliche **GMP^{Prg}** als Transkriptionsstarter zu verwenden und dieses dann nach der *in-vitro*-Transkription (post-synthetisch) durch CuAAC mit **DAB-N₃** zu modifizieren.

71

Nach Durchführung der *in-vitro*-Transkription im Zulaufverfahren und mit **GMP^{Prg}** als Transkriptionsstarter, wurden die Enzyme durch PCI-Extraktion entfernt und die RNA aus wässriger Lösung durch Zugabe von EtOH gefällt. Ohne weitere Reinigungsschritte wurde im Anschluss die CuAAC durchgeführt. Dafür wurde das RNA-Pellet in Wasser gelöst (~50 µM) und mit **DAB-N₃** in einer Endkonzentration von 500 µM versetzt. Aufgrund der Empfindlichkeit von RNA gegenüber Kupfer-vermittelten Strangbrüchen, wurden zuerst THPTA (3.75 mM) sowie NaAsc (7.5 mM) und erst dann CuSO₄ × 5H₂O (0.75 mM) zugegeben. Die Reaktionslösung wurde mit einem Argongasstrom entgast und für zwei Stunden bei 25 °C geschüttelt. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe des Kupferion-komplexierenden EDTA abgebrochen und nicht umgesetztes Azid durch

* Alle UHPLC/UV-Vis/MS-Analysen wurden extern durchgeführt.

PCI-Extraktion und Zentrifugenfiltration nach dem Größenausschlussprinzip abgetrennt. Letzteres entfernte zudem nicht inkorporierte Ribonukleotide aus der *in-vitro*-Transkription. In der UHPLC/UV-Vis/MS-Analyse konnten sowohl unmodifizierte prä-miR-142 (56 %) als auch ^{DAB}prä-miR-142 (23 %) nachgewiesen werden; ^{Prg}Prä-miR-142 hingegen wurde nicht detektiert. Diese Beobachtung ließ zwei Rückschlüsse zu: **GMP^{Prg}** konnte in der *in-vitro*-Transkription erfolgreich in ein prä-miR-142-Transkript integriert werden und diese modifizierte RNA konnte im Anschluss durch CuAAC sehr effizient zur gewünschten ^{DAB}prä-miR-142 umgesetzt werden.

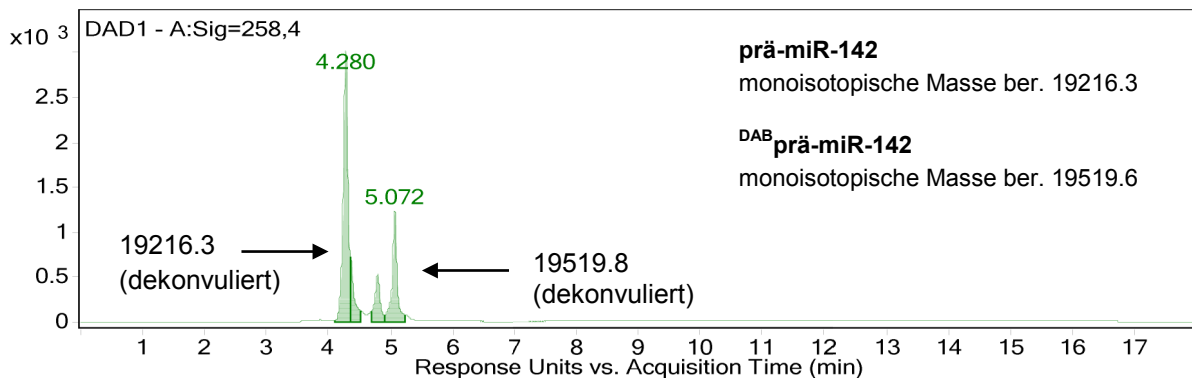


Abb. 4-36 | UHPLC/UV-VIS/MS-Analyse nach *in-vitro*-Transkription und CuAAC

Die nachfolgende Trennung des Gemisches prä-miR-142/^{DAB}prä-miR-142 gelang durch HPLC mit UV-Vis-Detektion bei 260 und 485 nm und mit MeCN in 0.1 M TEAA-Puffer (pH 7.0) als Laufmittelgemisch. Analog dieser Vorgehensweise wurden auch die DAB-markierten prä-miRNAs ^{DAB}prä-let7, -122 und -21 hergestellt. Die dabei isolierten Mengen an Gesamt-RNA lagen in einem Bereich von 2.5 nmol bei einem Transkriptionsansatz von ca. 300 µl und das Verhältnis von isolierter ^{DAB}prä-miR/prä-miR bei ca. 3:7.

Um **pUp^{FAM}** am 3'-OH-Ende der ^{DAB}prä-miRs einzuführen, wurde die *T4 RNA Ligase 1* benutzt. Dazu wurden die HPLC-gereinigten DAB-modifizierten prä-miRNAs mit Ligationspuffer sowie DMSO mit einem Endvolumenanteil von 20 % DMSO verdünnt, für 2 min auf 95 °C erwärmt und anschließend für 5 min auf Eis gestellt. DMSO bewirkt eine Denaturierung der prä-miRNAs und sollte sicher stellen, dass die Sekundärstruktur der prä-miRNAs das 3'-Ende nicht abschirmt.^[165] Nach Zugabe von **pUp^{FAM}** wurden keine Löslichkeitsprobleme beobachtet. Die Reaktionslösung wurde mit ATP und *T4 RNA Ligase 1* versetzt und für 20 h bei 16 °C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend durch PCI-Extraktion entfernt und die Ligationsprodukte durch HPLC mit UV-Vis-Detektion bei 260 und 485 nm und mit dem Laufmittelgradient 0→40 % MeCN in 0.1 M TEAA-Puffer (pH 7.0) gereinigt. Dieser Gradient wurde bereits für die Reinigung der ^{DAB}prä-miR-Transkripte verwendet. Die Beobachtung, dass für alle prä-miRNAs die Vis_{485nm}-Spur des HPLC-Chromatogramms keinen Peak bei der Retentionszeit der ^{DAB}prä-miRs (*t_R* ~ 34 min) zeigte, deutet darauf hin, dass die Ligation zum ^{DAB}prä-miR^{FAM}-Produkt

($t_R \sim 36$ min) sehr effizient verlief. Die Reinheit und Identität der Sonden wurden mittels UHPLC/UV-VIS/MS nachgewiesen (s. Anhang). Die vergleichende Belichtung des denaturierenden 20%igen PAGE-Gels vor und nach Anfärben mit dem Nukleinsäuremarker *SYBR® Gold* demonstrierte die fluoreszierenden Eigenschaften der $\text{DABprä-miR}^{\text{FAM}}$ -Sonden; der Vergleich mit der RNA-Leiter belegte die Bildung des Vollständigproduktes (Abb. 4-37).

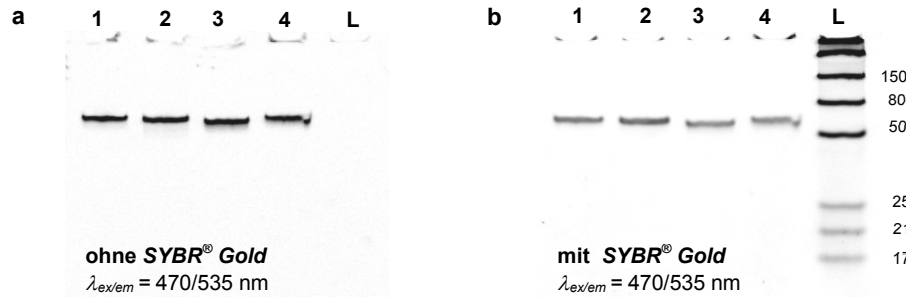


Abb. 4-37 | 20%iges denat. PAGE-Gel der $\text{DABprä-miR}^{\text{FAM}}$ -Sonden | a 20%iges denat. PAGE-Gel vor Anfärben mit *SYBR® Gold*. | **b** 20%iges denat. PAGE-Gel nach Anfärben mit *SYBR® Gold* | Legende: 1 = DABprä-let7^{FAM}, 2 = DABprä-miR-21^{FAM}, 3 = DABprä-miR-122^{FAM}, 4 = DABprä-miR-142^{FAM}, L = RNA-Leiter.

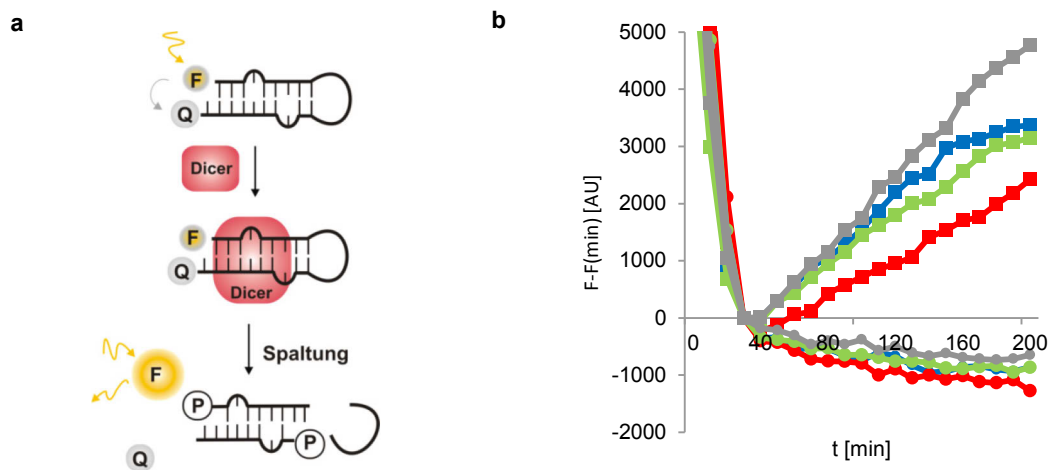


Abb. 4-38 | Prozessierung der prä-miRNA-Sonden durch *Dicer* | a Schematische Darstellung der Funktionsweise der prä-miRNA-Sonden | **b** Aufgetragen ist die Fluoreszenzintensität ($F-F_{\min}$) pro min bei Inkubation der entsprechenden prä-miR (20 nM) bei 37 °C mit denat./nat. Dicer (je 0.05 U_{abs}): prä-miR-142 (●/■), prä-miR-21 (●/■), prä-miR-122 (●/■), prä-miR-142 (●/■), $\lambda_{\text{ex/em}} = (485/520 \pm 5)$ nm, Mittelwerte aus Dreifachbestimmungen.

Anhand der $\text{DABprä-miR}^{\text{FAM}}$ -Sonden wurde demonstriert, dass das entwickelte chemoenzymatische Synthesekonzept aus *in-vitro*-Transkription, CuAAC und Ligation in Kombination mit den Nukleotiden pUp^{FAM} sowie GMP^{Prg} eine vielversprechende Alternative zur Festphasensynthese bieten kann, um terminal modifizierte prä-miRNAs zu synthetisieren. Im nächsten Schritt sollte geprüft werden, ob diese durch *Dicer* prozessiert werden. Wäre dies der Fall, müsste die Fluoreszenzintensität des FAM-Fluorophors, als Folge des fehlenden Kontakt-*Quenchings* durch den Fluoreszenzlöcher DAB, über die Zeit zunehmen (Abb. 4-38a). Deshalb wurden alle vier $\text{DABprä-miR}^{\text{FAM}}$ -

Sonden bei einer Konzentration von 20 nM mit 0.05 U_{abs.} nativem *Dicer* versetzt und der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität über 200 min bei 37 °C verfolgt. Zum Vergleich wurden alle Sonden auch mit hitzeinaktiviertem *Dicer* (0.05 U_{abs.}) behandelt. In diesem Experiment war für alle vier Sonden bei der Zugabe von nativem *Dicer* nach einer Initiationsphase von ca. 25 min ein Fluoreszenzanstieg zu beobachten, im Fall der mit denaturiertem *Dicer* versetzten Sonden blieb der Anstieg jedoch aus (Abb. 4-38b). Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die hergestellten Sonden die miRNA-Reifung *in vitro* detektieren können.

4-5 | Synthese einer prä-miRNA-Sonde zur Detektion der miRNA-Reifung *in cellulo*

Mit der Intention durch eine CuAAC-enzymatische Funktionalisierungsstrategie prä-miRNA-Sonden herzustellen, welche die miRNA-Reifung *in cellulo* detektieren können, wurde im vorangegangenen Abschnitt die Synthese von vier verschiedenen ^{DAB}prä-miRNA^{FAM}-Sonden beschrieben. FAM ist jedoch als Fluorophor ($\lambda_{ex/em} = 490/520$ nm) für Applikationen in der Zelle nicht optimal, denn ein zellkompatibler Fluorophor sollte Anregungs- und Emissionswellenlängen besitzen, die außerhalb der zellulären Autofluoreszenz liegen, die z. B. durch NADPH ($\lambda_{ex/em} \sim 340/450$ nm) und Flavin-Koenzyme wie FAD oder FMN ($\lambda_{ex/em} \sim 450/520$ nm) erzeugt werden.^[166] Darüber hinaus führt die Anregung von FAM leicht zu einer photoinduzierten chemischen Zerstörung des Moleküls und damit zum Verlust der fluoreszierenden Eigenschaft (*Photobleaching*).^[167] Alexa Fluor® 633 (ALX) hingegen gilt als photostabil, besitzt ein Absorptionsmaximum von 632 nm sowie ein Emissionsmaximum bei 647 nm und kann von DAB durch Kontakt-*Quenching* gelöscht werden.^[168] Aufbauend auf den vielversprechenden Ergebnissen der chemo-enzymatisch synthetisierten ^{DAB}prä-miRNA^{FAM}-Sonden, sollte eine prä-miR-122 Sonde hergestellt werden, die 3'-terminal mit ALX und 5'-terminal mit DAB verknüpft ist. Da ALX aber Azid-modifiziert kommerziell nicht vertrieben wird und die Synthese dafür sehr anspruchsvoll ist, musste das chemo-enzymatische Synthesekonzept abgeändert werden.

Dazu wurde die prä-miR-122 retrosynthetisch in zwei Teile zerlegt, von denen das ALX-markierte 10 nt-lange Oligonukleotid vom 3'-Ende (**prä-miR-122-B^{ALX}**) käuflich erworben wurde und welches an das DAB-modifizierte Reststück ^{DAB}**prä-miR-122-A** ligiert werden sollte (Abb. 4-39). Um den Anforderungen der T4-RNA-Ligation zu genügen, war die 5'-Hydroxylfunktion am 5'-Ende von **prä-miR-122-B^{ALX}** monophosphoryliert und um intramolekulare Ligationen zu verhindern war das 3'-Ende 3'-O-ALX-derivatisiert. Das DAB-markierte Oligonukleotid ^{DAB}**prä-miR-122-A** wurde analog den zuvor thematisierten ^{DAB}prä-miRs mittels *in-vitro*-Transkription und anschließender CuAAC mit **DAB-N₃** hergestellt. Anschließend wurde ^{DAB}**prä-miR-122-A** in Gegenwart eines dreifachen Überschusses an **prä-miR-122-B^{ALX}** ligiert und das RNA-Rohprodukt durch HPLC gereinigt. Ein zuvor entnommenes Aliquot wurde zusammen mit der produktenthal-

tenden Fraktion der HPLC mittels eines 20%igen denat. PAGE-analysiert (Abb. 4-39a). Anhand der Banden im *SYBR*[®]-*Gold* angefärbten Gel wird deutlich, dass die Ligation der beiden Oligonukleotide nahezu quantitativ verlief. Zudem belegt ein 8%iges denat. PAGE-Gel in Abwesenheit von *SYBR*[®] *Gold* mit $\lambda_{ex/em} = 630/700$ nm das Vorhandensein des ALX-Fluorophors.

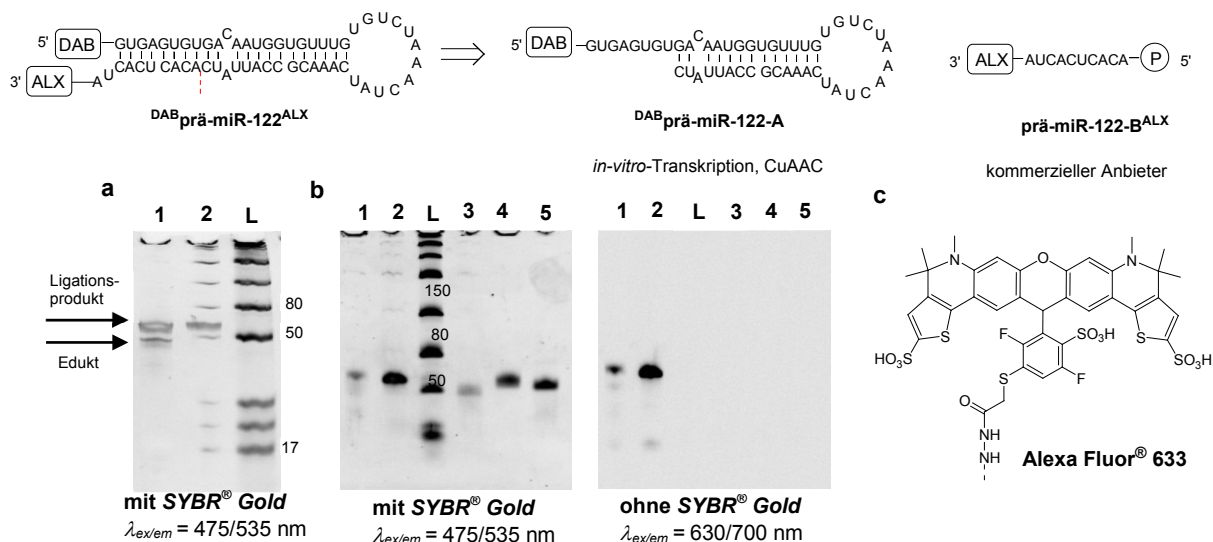


Abb. 4-39 | Analyse und Retrosynthese der DABprä-miR-122ALX-Sonde | a 20%iges denat. PAGE-Gel nach Anfärben mit *SYBR*[®] *Gold*, Legende: 1 = DABprä-miR-122ALX vor HPLC, 2 = DABprä-miR-122ALX nach HPLC, verunreinigt mit L, L = RNA-Leiter | b 8%iges denat. PAGE-Gel nach und vor Anfärben mit *SYBR*[®] *Gold*, Legende: 1 = DABprä-miR-122ALX, 2 = prä-miR-122ALX, 3 = DABprä-miR-122-A, 4 = DABprä-miR-122FAM, 5 = prä-miR-122 L = RNA-Leiter. | c Strukturformel von ALX.^[169]

75

Um zu untersuchen, ob DABprä-miR-122ALX *in vitro* von *Dicer* prozessiert werden kann, wurde die Sonde (90 nM) bei 37 °C mit nativem und hitzeaktiviertem *Dicer* (0.5 U_{abs}) inkubiert und alle 60 min ein Fluoreszenzspektrum aufgenommen (Abb. 4-40). Während sich die Fluoreszenzintensität bei $\lambda_{em} = 647$ nm bei der mit nativem *Dicer* behandelten Sonde innerhalb von 4 h verfünffachte, stieg die Fluoreszenzintensität der mit denaturiertem *Dicer* inkubierten Sonde nur direkt nach Zugabe des Enzyms an und blieb dann konstant. Daraus kann geschlossen werden, dass diese Sonde prinzipiell auch für die Visualisierung der miRNA-Reifung in der Zelle geeignet ist. Des Weiteren wurde die aus der *in-vitro*-Transkription erhaltene unmodifizierte prä-miR-122-A mit prä-miR-122-BALX ligiert und mittels HPLC gereinigt. Die so erhaltene fluorogene prä-miR-122ALX kann z. B. hilfreich sein, um die Bedingungen der Zelltransfektion zu optimieren, da eine Zunahme der Fluoreszenzintensität innerhalb der Zelle beim Emissionsmaximum des ALX-Fluorophors (647 nm) in diesem Fall nicht von der Reifung durch *Dicer* abhängen würde. Die Experimente dazu konnten im Rahmen dieser Dissertation jedoch nicht abgeschlossen werden.

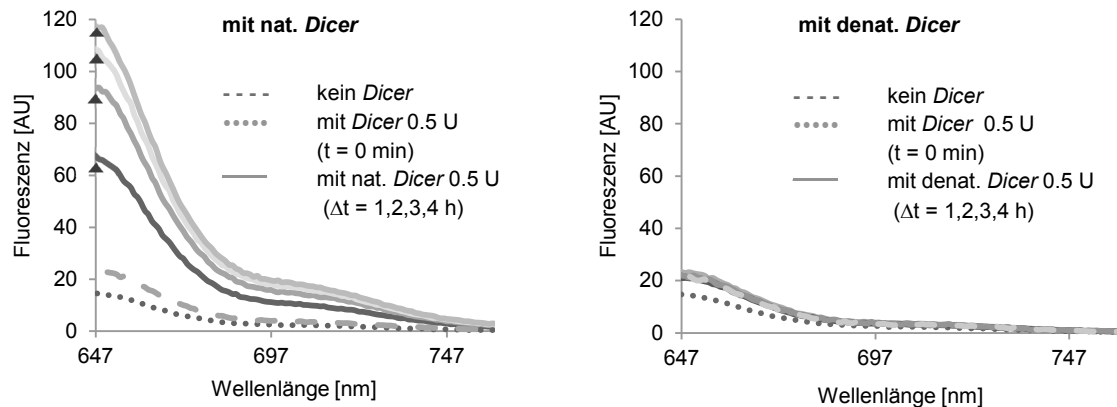


Abb. 4-40 | Spaltung der ^{DAB}prä-miR-122^{ALX} durch Dicer | Gezeigt sind Fluoreszenzspektren von 647 - 750 nm, aufgenommen alle 60 min mit $\lambda_{ex} = (633 \pm 5)$ nm, $\lambda_{em} (645 - 750 \pm 5)$ nm, ^{DAB}prä-miR-122^{ALX} (90 nM) in Dicer-Puffer, bei 37°C mit nat./denat. Dicer (0.5 U).

4-6 | Chemo-enzymatisches, ortsspezifisches, internes Labeling von RNA

Unabhängig von den Arbeiten an den fluoreszenzbasierten prä-miRNA-Sonden trat bei Literaturrecherchen ein Mangel an bestehenden Möglichkeiten für das chemo-enzymatische, ortsspezifische, interne Labeling von RNA zu Tage. Im Zuge der Synthese der ALX-modifizierten prämiRNA entstand die Idee, dieses Problem durch eine Kombination aus post-synthetischer Funktionalisierung durch CuAAC sowie T4-RNA-Ligation von Nukleosidbisphosphaten bzw. Oligonukleotiden zu lösen. Dazu müsste das 3'-Ende einer RNA um das Nukleotid **pUp^{Alk}** verlängert und dessen 3'-Phosphat durch enzymatische Dephosphorylierung mit *Calf-Intestine Phosphatase* (CIP) entfernt werden. Dabei würde eine 3'-Hydroxylfunktion im Uridin generiert werden, die anschließend mit einem Oligonukleotid ligiert werden könnte. Dabei würde die Alkinfunktion an eine interne Position rücken und könnte anschließend mit Azid-modifiziertem FAM konjugiert werden. Vor kurzem wurde über eine ähnliche Strategie berichtet, in der eine poly(A)-Polymerase nach aufwändiger Optimierung von Reaktionsbedingungen ausschließlich ein Azid-funktionalisiertes rNTP an das 3'-Ende einer RNA fügte. Dieses Ende konnte anschließend durch eine Templat-abhängige Ligation erneut verlängert und die Azidfunktion durch CuAAC mit verschiedenen Alkinderivaten verknüpft werden.^[125b]

Um zu untersuchen, ob sich **pUp^{Alk}** in Kombination mit der *T4 RNA Ligase 1* auch für ein internes, ortsspezifisches Labeling von RNA eignet, wurde ein unmodifiziertes prä-let7-Transkript durch T4-RNA-Ligation mit **pUp^{Alk}** verlängert. Die Ligationsbedingungen waren identisch mit denen der pUp^{FAM}-Ligation, allerdings wurde das Rohprodukt nach PCI-Extraktion ausschließlich durch Größenausschluss-Zentrifugenfiltration gereinigt. Eine anschließende UHPLC/UV-Vis/MS-Analyse belegte die Vollständigkeit der Ligation sowie die Reinheit des gewünschten Produktes, was die hohe Effizienz der Ligationsreaktion mit dem **pUp^{Alk}** demonstriert. Die **prä-let7^U** wurde durch Behandlung mit CIP innerhalb von 60 min bei 37 °C dephosphoryliert und dann mit der 10 nt-langen,

3'-, 5'-terminal phosphorylierten **prä-miR-122-C** (10 Äq.) ligiert. Nach 20 h bei 16 °C wurde durch Verwendung von Größenausschluss-Zentrifugenfiltern nicht umgesetzte **prä-miR-122-C** abgetrennt und das Ligationsprodukt aufkonzentriert. Abschließend wurde damit eine CuAAC mit **FAM-N₃** durchgeführt. Analog wurde für das unmodifizierte prä-miR-122-A-Transkript verfahren, das nach Ligation mit der **prä-miR-122-C** eine partiell-komplementäre Haarnadelstruktur ausbilden kann, wohingegen bei der **prä-let7^U**-Verlängerung ein nicht-hybridisierter Überhang entsteht (Abb. 4-41). Die Ligationsprodukte wurden abschließend durch ein 8 %iges denat. PAGE-Gel mit und ohne *SYBR®-Gold*-Anfärben analysiert (Abb. 4-42). Beide Transkripte wurden nahezu vollständig mit **prä-miR-122-C** ligiert (prä-mir122: Tasche 3, prä-let7: Tasche 7). In der anschließenden CuAAC wurde allerdings ausschließlich die verlängerte prä-let7 mit FAM markiert (prä-mir122: Tasche 4 und 5, prä-let7: Tasche 8). Eine mögliche Erklärung könnte lauten, dass die Alkinfunktion im prä-let7-Ligationsprodukt für den THPTA-Cu^I-Komplex leichter zugänglich ist als in dem prämiR-122-Ligationsprodukt: Während sich bei ersterem die Alkinfunktion in einem einzelsträngigen RNA-Abschnitt befindet, liegt das Alkin beim prämiR-122-Analogon in einem Duplexbereich, der nur durch einen 1-nt-*bulge* aufgeweitet wird. Eine ähnliche Abhängigkeit vom Zugang zur Alkinfunktion wurde zuvor schon an DNA-Einzelsträngen und Duplexen beobachtet.^[170] Sollte dies tatsächlich das Problem sein, könnte eine Erweiterung des Abstands zwischen Nukleobase und Alkinfunktion durch einen Linker eine mögliche Lösung sein (vgl. Abb. 2-27a, **16**).

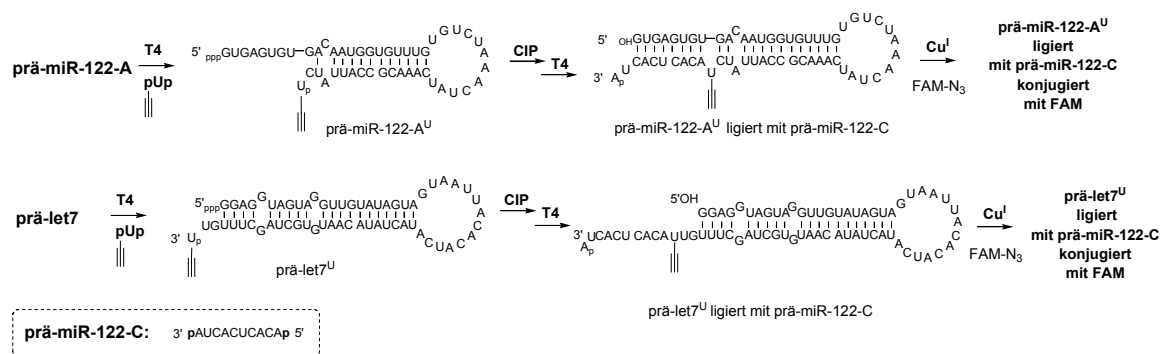


Abb. 4-41 | Synthesekonzept des chemo-enzymatischen, ortsspezifischen, internen Labelings | Die Sekundärstrukturen der verlängerten Ligationsprodukte wurden mit *Mfold* ermittelt.

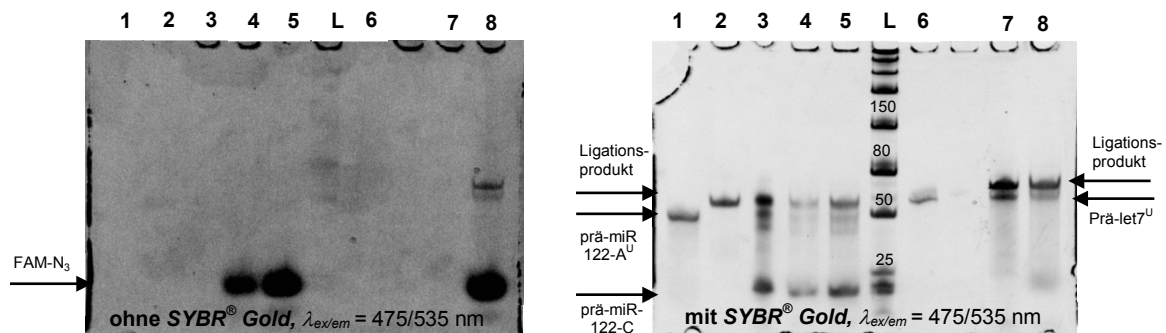


Abb. 4-42 | Internes Markieren von prä-miRNAs | 8 % denat. PAGE-Gel | Legende: 1 = prä-miR-122-A^U, 2 = prä-miR-122, 3 = Ligationsprodukt prä-miR-122-A^U mit prä-miR-122-C, 4 und 5 Ligationsprodukt aus 3 nach CuAAC in verschiedenen Konzentrationen, 6 = prä-let7^U, 7 = Ligationsprodukt prä-let7^U mit prä-miR-122-C, 8 = Ligationsprodukt aus 7 nach CuAAC mit FAM-N₃, L = RNA Leiter.

5 | Zusammenfassung und Ausblick

5-1 | Synthese und Screening von Inhibitoren der miRNA-Reifung

Als Folge der mehrfach belegten Kausalität zwischen aberranten miRNA-Expressionsmustern und Krankheiten wie z. B. Krebs werden miRNAs verstärkt als Zielmoleküle der Pharmaforschung diskutiert. In Fällen, in denen eine Krankheit durch einen erhöhten miRNA-Spiegel verursacht wird, ist die Inhibierung der miRNA-Reifung durch niedermolekulare Verbindungen ein möglicher therapeutischer Ansatzpunkt. Im Rahmen dieser Dissertation wurde untersucht, inwieweit sich dimerisierte Aminoglykoside eignen, um durch eine Bindung an die prä-miRNA den *Dicer*-vermittelten Reifungsschritt zu hemmen. Die Dimerisierung zielte einerseits darauf ab, die Bindungsaffinität zu verstärken, andererseits sollte anhand dieser Verbindungen untersucht werden, ob sich dadurch auch eine selektive Inhibition erzielen lässt. Da die dreidimensionale Struktur von prä-miRNAs sehr dynamisch und mit den heutigen Methoden nur ungenau vorhersagbar, erschien der modulare Aufbau einer strukturell diversen Substanzbibliothek potentieller prä-miRNA-Binder zweckmäßig. Vor diesem Hintergrund sollten jeweils Propargyl- bzw. Pentinyl-modifizierte 2-Desoxystreptamin- sowie Neaminderivate durch CuAAC mit einer Reihe von kurzen, langen, hydrophoben, hydrophilen, starren, flexiblen, aliphatischen bzw. aromatischen Bisaziden verknüpft werden.

Im ersten Abschnitt dieses Projektes wurde der Zugang zu enantiomerenreinem 4-*O*-Propargyl-2-Desoxystreptamin (**D**) etabliert. Dies gelang mit einer Gesamtausbeute von 30 % in sieben Schritten ausgehend von Neomycinsulfat B, durch die Verwendung von Boc- und Cyclohexylidenschutzgruppen. Die Synthese des Pentinylderivats (**D***) erfolgte analog (Gesamtausbeute 32 %). Die erarbeitete Methode stellt damit gegenüber der von Thomas *et al.* und Greenberg *et al.* vorgeschlagenen Synthese mit elf Stufen und einem racemischen Endprodukt eine praktikable Alternative dar. Da die RNA-Erkennung durch

Aminoglykoside maßgeblich von der Anzahl der Aminogruppen abhängt, sollte neben den 2-DOS-Derivaten, zusätzlich auch Neamin an der 4'-Hydroxylposition mit einem Propargylrest funktionalisiert werden (**N**). Unter den Bedingungen einer Williamson Ethersynthese wurde jedoch stattdessen eine Alkylierung der 6'-Carbamatgruppe beobachtet. Bei der Verwendung von CsOH oder KO^tBu als Base konnte hingegen nur eine 3'→4'-O-Silylwanderung festgestellt werden. Daher wurde für den Aufbau der Substanzbibliothek das 6'-N-Propargyl-modifizierte Neaminderivat eingesetzt. Die außerdem dafür benötigten Bisazide wurden durch nukleophile Substitution oder Diazotransfer, ausgehend von den korrespondierenden Bisamin- bzw. Bishalogenverbindungen gewonnen. Zusammen mit den im Arbeitskreis vorhandenen bzw. kommerziell vertriebenen Aziden, standen 43 strukturell sehr vielfältige Azid-funktionalisierte Linker für eine Verknüpfung mit den alkinylierten Aminoglykosiden zur Verfügung.

Die Durchführung der CuAAC erfolgte im µmol-Maßstab. Angesichts dessen und auch im Hinblick der Vielzahl an geplanten Umsetzungen, war es wichtig ein Set-Up zu finden, dass sich für die Synthese aller angestrebten Dimere eignet. Dies konnte schließlich durch Verwendung der Boc- und Cyclohexylden-geschützten Neamin- bzw. 2-Dos-Derivate, statt der entsprechend ungeschützten Verbindungen realisiert werden (Abb. 5-1). Vor allem die säulenchromatografische Reinigung der Zielverbindungen wurde dadurch vereinfacht. Diese wurde nach einem jeweils festen Gradientenprotokoll für die 2-DOS- und Neaminverbindungen durchgeführt. Anschließend wurden die Schutzgruppen abgespalten. Trotz der strukturellen Diversität der Bisazide konnten mit diesem Verfahren alle gewünschten Zielverbindungen mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 44 % isoliert werden. Dabei wurde für alle 2-DOS- bzw. Neamindimere das gleiche Procedere angewandt – eine Fall-zu-Fall-Optimierung war nicht nötig. Die erarbeitete Synthesestrategie erwies sich daher als überaus effiziente Methode um eine Substanzbibliothek mit insgesamt 88 Mitgliedern aufzubauen. Die Reinheit der Testverbindungen wurde anhand von UPLC/UV-VIS/MS-Analyse mit einer PDA-Detektion von 200 – 800 nm bestimmt und lag bei durchschnittlich 90 %. Eine zusätzliche Charakterisierung aller Testsubstanzen, mittels ¹H- und ¹³C-NMR-Spektroskopie sowie hochaufgelöster Massenspektrometrie, sollte die Ergebnisse des nachfolgenden Screenings auf eine solide Grundlage stellen.

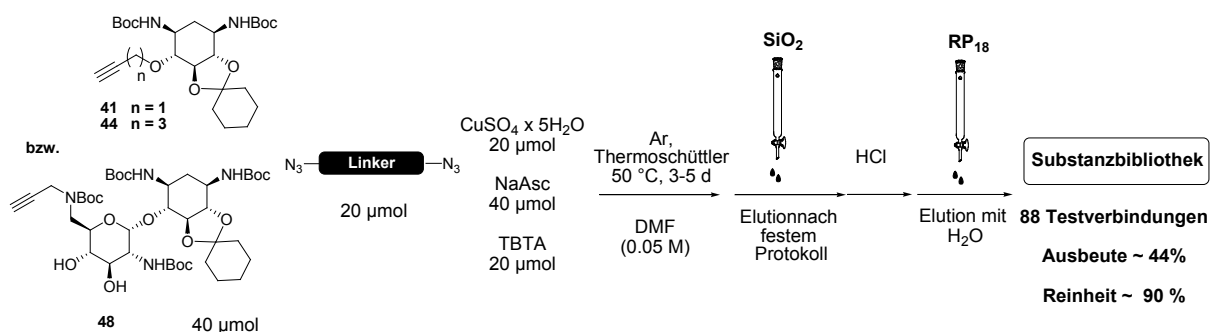


Abb. 5-1 | Schema zum Aufbau der Substanzbibliothek durch CuAAC

Erstmalig wurde eine Substanzbibliothek dieser Größe in einem BRCA-Reifungsassay auf die Inhibition der miRNA-Reifung getestet. Um gezielt nach selektiven Inhibitoren zu suchen, wurden kompetitive Assays mit den prä-miRNA-Paaren prä-let7/-Bantam sowie prä-miR-21/-122 durchgeführt. Dabei wurden neun Inhibitoren für die Bantam-, 26 für die let7-, 21 für die miR-21- und 13 für die miR-122-Reifung identifiziert, die IC₅₀-Werte im Bereich von 5 µM (Dimere mit 2-DOS) bzw. 0.5 µM (Dimere mit Neamin) aufwiesen. Die nicht dimerisierten, alkinylierten 2-DOS-Derivate sowie 2-Desoystreptamin selbst zeigten ebenso wie die entsprechenden Neaminverbindungen bei diesen Konzentrationen keine Inhibition. Demzufolge lassen sich durch eine Dimerisierung die Inhibitionswerte deutlich steigern.

Der Umfang der Bibliothek und die Diversität ihrer Mitglieder ermöglichten zudem eine erste Interpretation der Zusammenhänge zwischen Struktur der aminoglykosidischen Dimere und ihrer Fähigkeit die miRNA-Reifung zu inhibieren. Allgemein waren Verbindungen, die über einen starren Linker miteinander verbunden waren, potenter als vergleichbar lange, aber flexiblere Dimere. Um Einblicke darüber zu bekommen, welchen Einfluss die Linkerlänge hat, wurden ausgewählte Bisamine beidseitig um eine Azidoacetyl-Einheit verlängert, jedoch konnten aus der Gegenüberstellung der jeweiligen Inhibitionswerte keine eindeutigen Trends abgelesen werden. Allerdings wurden für Azide, welche die Aminoglykoside in sehr kurzen Abständen voneinander anordnen, wie z. B. die Naphthalin- oder Benzylbisazide generell schlechte Inhibitionswerte beobachtet. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass unter den potentesten Verbindungen einige Linker besonders häufig vertreten sind, darunter jene mit einem Anthracen-, Fluoren-, Diazobenzen- oder *p*-Terphenylgerüst, die bekanntermaßen gut in DNA-Duplexe interkalieren. (Abb. 5-2). Obwohl für RNA aufgrund der Anordnung ihrer Furchen eine solche Art der Bindung eher untypisch ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Aromaten bei der Bindung der prä-miRNA im Vergleich zu den Aminoglykosiden eine übergeordnete Rolle spielen. Im Übrigen wurde im Fall der Bantam-Reifung für sechs Verbindungen (DA43, D*A5, D*A20, D*A37, NA31, NA37) das Phänomen der Reifungsaktivierung mit „Aktivierungswerten“ von bis zu – 100 % beobachtet. Die Ursache dafür blieb unklar.

81

Die Auswertungsergebnisse des initialen Screenings bei Konzentrationen von 5/0.5 µM (2-DOS-/Neaminkonjugate) deuteten an, dass einige Testsubstanzen die Reifung einer bestimmten miRNA selektiv inhibieren können. Um diesbezüglich fundierte Aussagen zu erhalten, wurden für sechs Inhibitoren IC₅₀-Kurven ermittelt. Aus der Steilheit der Kurven wurde ersichtlich, dass das Konzentrationsfenster, in dem die Inhibition von 100 auf 0 % sinkt, in der Regel sehr klein ist. Dementsprechend sind Aussagen über die Selektivität einer Verbindung anhand einer einzelnen Konzentration nicht aussagekräftig. Stattdessen müssen die aus den Kurven errechneten IC₅₀-Werte herangezogen werden. Deren direkter Vergleich belegte für die ausgewählten Verbindungen aber nur margi-

nale Präferenzen gegenüber der konkurrierenden prä-miRNA. Demgemäß eignete sich das Dimerisierungs-Konzept in den gewählten Beispielen zwar dazu, um Bindungsaffinitäten zu steigern, Selektivität ließ sich damit jedoch nicht generieren.

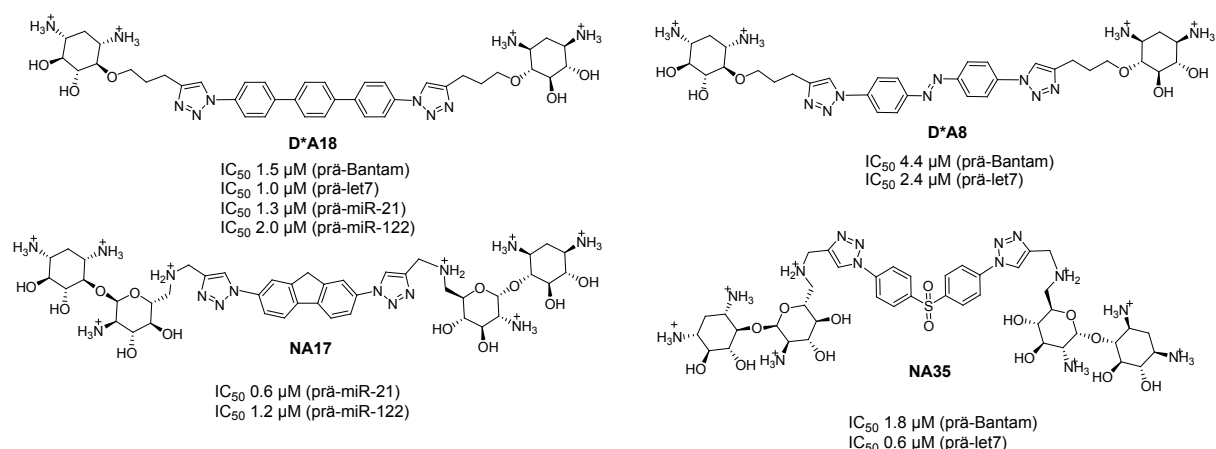


Abb. 5-2 | Strukturen und IC_{50} -Werte ausgewählter Inhibitoren der miRNA-Reifung

In diesem Zusammenhang wäre es interessant, in weiterführenden Studien zu untersuchen, inwieweit sich die Selektivitäten und Affinitäten verändern, wenn man systematisch die Abstände, in denen die Aminoglykoside präsentiert werden, variiert. Dahin-
 gehend könnte man z. B. mehrere Alkin-funktionalisierte Aminoglykoside mit
 Azidoproline konjugieren.^[171] In wässrigen Medien weisen die an jeder dritten Einheit
 funktionalisierten Oligoproline eine helikale Struktur auf, deren Azidofunktionen eine
 definierte und seitenspezifische Ausrichtung besitzen und die einen Abstand voneinan-
 der haben, der dem von 4 nt entspricht. Zudem hat dieses erste umfassende Screening
 Fragen aufgeworfen, wie z. B. die nach der Ursache für die Substrataktivierung oder dem
 genauen Bindungsmodus von Anthracen- oder Fluoren-enthaltenden Dimeren, deren
 systematische Untersuchung einen wichtigen Beitrag für das bessere Verständnis der
 Grundlagen der RNA-Erkennung leisten können. Im Übrigen könnte es aufschlussreich
 sein, für ausgewählte Aminoglykosiddimere *Docking* Studien oder *Footprinting* Assays
 durchzuführen, um Informationen über die Bindungsstelle zu erhalten. Solche
 Erkenntnisse könnten dann dazu dienen, die Struktur von multivalenten prä-miRNA-
 Bindern auf Aminoglykosid-Basis zu optimieren, um eine selektive Inhibition der
 miRNA-Reifung zu erreichen.

5-2 | Chemo-enzymatische Funktionalisierung von prä-miRNAs

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der Herstellung von prä-miRNA-Sonden, die für die Detektion der miRNA-Reifung *in cellulo* eingesetzt werden können. Vor diesem Hintergrund sollte eine chemo-enzymatische Funktionalisierungsstrategie auf Basis von CuAAC, *in-vitro*-Transkription sowie Ligation entwickelt werden, mit der die 3'- und 5'-Enden von prä-miRNAs gezielt modifiziert werden können. Dafür wurden zwei verschiedene Alkin-derivatisierte Ribonukleotide benötigt, die sich durch CuAAC mit Azid-modifizierten Fluorophoren bzw. Fluoreszenzlöschern konjugieren und anschließend durch die *T7*-RNA Polymerase bzw. *T4 RNA Ligase 1* an das 5'- bzw. 3'-Ende der prä-miRNA einführen lassen. Für keines der beiden Nukleotide war der synthetische Zugang beschrieben.

In diesem Kontext wurde zunächst die Herstellung des Ligationsbausteins thematisiert, der aufgrund des Mechanismus der *T4 RNA Ligase 1* sowohl an der 3'- als auch 5'-Hydroxylfunktion bisphosphoryliert sein musste. Da sich die exocyclische Aminofunktion von Cytidin für die Einführung eines Alkins als ungeeignet erwies, fokussierten sich die Bemühungen anschließend auf die Synthese eines Alkin-modifizierten Uridinbisphosphats **pUp^{Alk}**, das ausgehend vom Uridin in acht Stufen mit einer Gesamtausbeute von 21 % in Form eines Triethylammoniumsalzes erhalten wurde. Die Einführung der Alkinfunktion an die C5-Position der Nukleobase gelang dabei durch Sonogashira-Kupplung eines TMS-geschützten Ethins. Eine Silyl-basierte Schutzgruppenstrategie ermöglichte abschließend zusammen mit Phosphoramiditen die 3',5'-*O,O*-selektive Phosphorylierung. Das so hergestellte **pUp^{Alk}** konnte zudem durch CuAAC mit 5/6-Carboxyfluorescein markiert werden (**pUp^{FAM}**). Für die Synthese des Transkriptionsstarters *O*-(5'-Guanosin)-*O*-propargylmonophosphat **GMP^{Prg}** wurde ebenfalls auf Phosphoramiditchemie zurückgegriffen. Dabei war zu berücksichtigen, dass die an ein P^{III}-gebundene Propargylgruppe durch intramolekulare Umlagerung zu einem allenyli-schen Phosphonat abreagieren kann. Daher wurde der Propargylalkohol bei der Kupplung in TMS-geschützter Form eingesetzt. Nach Abspaltung aller Schutzgruppen wurde die Zielverbindung mit einer Gesamtausbeute von 9 % isoliert und ein Teil davon durch CuAAC mit Azid-modifiziertem Dabcyl funktionalisiert (**GMP^{DAB}**).

83

Es wurde nachfolgend versucht **GMP^{DAB}** durch *in-vitro*-Transkription an das 5'-Ende einer prä-miRNA einzufügen. Dies scheiterte jedoch an Löslichkeitsproblemen im *in-vitro*-Transkriptionsansatz. Stattdessen wurde **GMP^{Prg}** verwendet, welches direkt im Anschluss an den enzymatischen Syntheseschritt durch CuAAC mit DAB modifiziert wurde. Sowohl die CuAAC-basierte Funktionalisierung als auch die anschließende Ligation des **pUp^{FAM}** an das 3'-Ende der ^{DAB}prä-miRNA verliefen sehr effizient. Mithilfe dieser Kombination chemo-enzymatischer Methoden wurden vier verschiedene prä-miRNAs mit DAB sowie FAM markiert, was die Allgemeingültigkeit dieser Modifizierungsstrategie verdeutlicht. Anhand dieser ^{DAB}prä-miR^{FAM}-Sonden wurde zudem der Nachweis er-

bracht, dass durch CuAAC funktionalisierte prä-miRNAs von *Dicer* als Substrat toleriert und prozessiert werden.

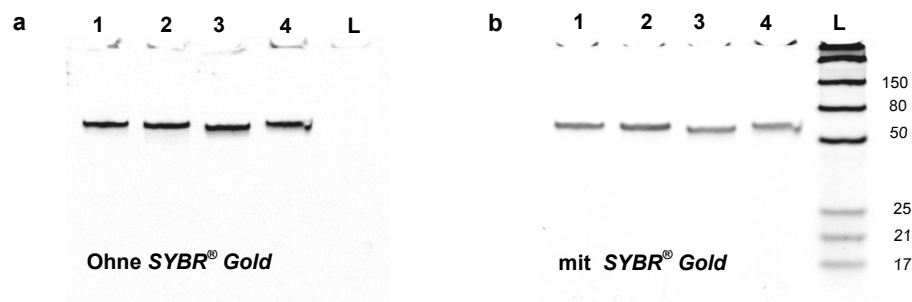


Abb. 5-3 | 20%iges denat. PAGE-Gel der ^{DAB}prä-miR^{FAM}-Sonden | **a** 20%iges denat. PAGE-Gel vor Anfärben mit SYBR[®] Gold, $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 475/535$ nm. | **b** 20%iges denat. PAGE-Gel nach Anfärben mit SYBR[®] Gold, Legende: 1 = ^{DAB}prä-let7^{FAM}, 2 = ^{DAB}prä-miR-21^{FAM}, 3 = ^{DAB}prä-miR-122^{FAM}, 4 = ^{DAB}prä-miR-142^{FAM}, L = RNA-Leiter.

Die etablierten Methoden zur chemo-enzymatischen Funktionalisierung von prämiRNAs wurden auch für die Synthese einer mit DAB und Alexa-Fluor[®]-633-(ALX) markierten prä-miR-122-Sonde eingesetzt. Aufgrund der Lage seiner Anregungs- sowie Emissionswellenlängenmaxima und einer höheren Photostabilität ist ALX für *in-cellulo*-Applikationen besser geeignet als FAM. Da ALX in Azid-modifizierter Form bislang nicht kommerziell vertrieben wird, wurde die Synthese der Sonde dahingehend abgewandelt, dass statt eines **pUp^{ALX}** ein ALX-modifiziertes 10 nt-kurzes Oligonukleotid erworben wurde, dessen Basensequenz den letzten 10 nt des 3'-Endes von der prä-miR-122 entspricht. Die Ligation an ein entsprechend um 10-nt-gekürztes ^{DAB}prämiR-122-Transkript verlief nahezu quantitativ. Abschließend wurde durch Inkubation mit *Dicer* bei 37 °C nachgewiesen, dass diese ^{DAB}prä-miR-122^{ALX}-Sonde durch das Enzym gespalten wird. Die Fluoreszenzintensität stieg in diesem Experiment innerhalb von 4 h auf das Fünffache an. Zusätzlich wurde eine nicht durch DAB gelöschte, fluorogene prä-miR-122^{ALX} hergestellt, die für die Optimierung von Zelltransfektionsbedingungen genutzt werden kann. Die ersten Vorversuche in diese Richtung wurden bereits unternommen, konnten aber im Rahmen dieser Arbeit für keine der hergestellten Sonden abgeschlossen werden.

Anhand der **prä-miR-122^{ALX}**-, **^{DAB}prä-miR-122^{ALX}**- sowie der **^{DAB}prä-miR^{FAM}**-Sonden (Abb. 5-4) wurde demonstriert, dass das entwickelte chemo-enzymatische Synthesekonzept aus *in-vitro*-Transkription, CuAAC und Ligation in Kombination mit den Nukleotiden **pUp^{FAM}** sowie **GMP^{Prg}** eine vielversprechende Alternative zur Festphasensynthese bieten kann, um terminal modifizierte prä-miRNAs zu synthetisieren. Die konsequente Fortführung dieses Projektes würde verlangen, nachzuweisen, dass sich die Sonden in Zellen transfizieren lassen und dies durch *Dicer*-Spaltung auch mit einem Anstieg der Fluoreszenzintensität verbunden ist. Zusammen mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie könnte man so z. B. die Orte der miRNA-Reifung innerhalb der Zelle visualisieren. Darüber hinaus könnte man die entwickelte

chemo-enzymatische Funktionalisierungsmethode auch für die Immobilisierung von prä-miRNAs auf Oberflächen nutzen. Dies würde z. B. im Zusammenhang mit der Etablierung eines Reifungsassays an fester Phase relevant sein oder ließe sich für die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie zur Bestimmung von K_D -Werten bei der Bindung von Aminoglykosiden an prä-miRNAs nutzen.

Des Weiteren entstand während der Arbeiten an der ALX-modifizierten prä-miRNA-Sonde die Idee, das Ribonukleotid **pUp^{Alk}** in Kombination mit einer zweiten Ligation eines Oligonukleotids und nachfolgender CuAAC für ein chemo-enzymatisches, ortsspezifisches internes Labeling von RNA zu nutzen. Zwar kann mithilfe der Festphasensynthese an beliebiger Stelle des Oligonukleotids eine gewünschte Modifizierung eingeführt werden, für enzymatisch erzeugte RNA hingegen ist die Anzahl der beschriebenen Möglichkeiten stark limitiert. Anhand der prä-let7 wurde demonstriert, dass sich **pUp^{Alk}** an das 3'-Ende ligieren und im Anschluss daran durch eine zweite Ligation, diesmal jedoch mit einem 10 nt-langen Oligonukleotid, „internalisieren“ ließ. Die RNA-interne Alkinfunktion konnte abschließend durch eine CuAAC mit FAM-N₃ modifiziert werden. Diese im Rahmen dieser Dissertation entwickelte Kombination chemo-enzymatischer Methoden, könnte daher in Zukunft eine wertvolle Strategie sein, um enzymatisch synthetisierte RNA ortsspezifisch, intern zu markieren.

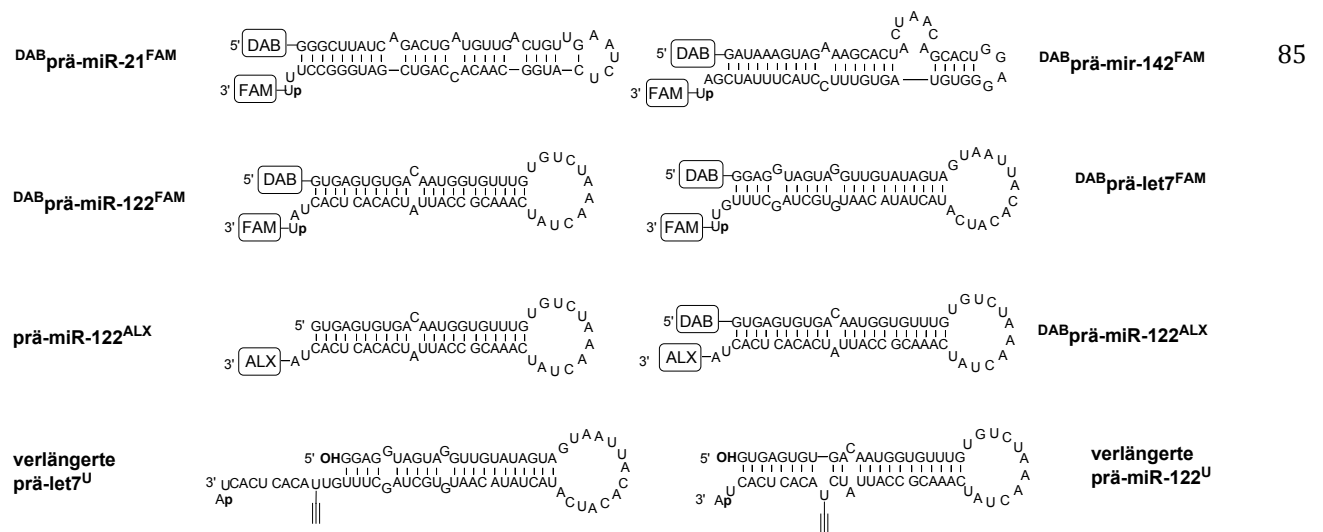


Abb. 5-4 | Überblick CuAAC-enzymatisch modifizierter prä-miRNAs

6 | Experimenteller Teil

6-1 | Chemikalien, Lösungsmittel, Puffer

Die eingesetzten Chemikalien wurden von den Unternehmen *Acros* (Geel, Belgien), *Sigma-Aldrich* (Taufkirchen), *TCI Europe* (Zwijndrecht, Belgien) und *Alfa Aesar* (Karlsruhe) geliefert. Neomycintrisulfathydrat sowie Azid **A36** und Azid **A41** wurden bei *Sigma-Aldrich* bestellt. Die Azide **A1**, **A28**, **A29**, **A30**, **A31** wurden bereits in der Diplomarbeit synthetisiert,^[105] **A32**, **A33**, **A34**, **A37**, **A38**, **A39** wurden freudlicherweise von Dipl.-Chem. Arne Berthelmann, **A42** von Dr. Denny Proksch, **A40** von Dr. Erika Sauer und *N,N*-Diisopropylphosphoramiditchlorid von Dr. Anke Roth bereitgestellt. Die Lösungsmittel EtOAc, Cyclohexan, CH₂Cl₂, MeOH wurden vor Gebrauch destilliert. Die als wasserfrei beschriebenen Lösungsmittel wurden entweder aus einem *solvent purification system SPS 800* von *MBraun* (Garching) entnommen (THF, DMF, CH₂Cl₂, Toluol) entnommen, über aktiviertem Molekularsieb 3 Å getrocknet und gelagert (Cyclohexan, MeCN, Et₂O, MeOH, EtOH, Pyridin, DIPEA, NEt₃) oder frisch destilliert (1,4-Dioxan). Reaktionen mit luft- bzw. hydrolyseempfindlichen Substanzen wurden mit im Feinvakuum ausgeheizten Glasgeräten und unter Anwendung der Schlenktechnik in einer Argon-Schutzgasatmosphäre durchgeführt. Zur Herstellung des 1 M TEAB-Puffers, pH 7.5 wurden 150 ml NEt₃ mit 900 ml H₂O der Qualitätsstufe 1 verdünnt, das in einer *Astacus Life Science* Wasserreinigungsanlage von *membraPure* (Hennigsdorf) aufbereitet wurde. Anschließend wurde mindestens 2 h gasförmiges CO₂ durch die Lösung geleitet, bis der pH auf 7.5 eingestellt war.^[172]

87

6-2 | Messgeräte und Hilfsmittel

Dünnschichtchromatografie | DC-Alufolien des Typs Kieselgel 60 F₂₅₄ bzw. RP₁₈ F_{254S} wurden von *VWR* (Darmstadt) erworben. Die Detektion der Substanzen erfolgte im UV-Licht ($\lambda = 254$ nm) oder durch Benetzen und anschließendes Erhitzen der DC-Platten mit folgenden Färbereagenzien: Seebachreagenz (25 g H₃[P(Mo₃O₁₀)₄] × H₂O, 10 g

$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 60 ml konz. H_2SO_4 , 905 ml H_2O), Ninhydrinlösung (1 g Ninhydrin, 125 ml EtOH), Zuckerfärbelösung (5 ml konz. H_2SO_4 , 95 ml EtOH) und KMnO_4 -Lösung (0.5 g KMnO_4 , 100 ml 1 M NaOH-Lösung).

Säulenchromatografie | Für die säulenchromatografischen Trennungen wurden als stationäre Phasen eingesetzt: Kieselgel 60 (Korngröße 63-200 μm) von *Merck*, DEAE-Cellulose, *fast flow fibers* von *Sigma-Aldrich*, DEAE-Sephadex® von *VWR*, RP₁₈-modifiziertes Kieselgel *POLYGOPREP* 60 - 50 C₁₈ sowie *CHROMABOND*® C₁₈ ec Polypropylensäulen zur Festphasenextraktion von *Macherey-Nagel* (Düren). Alle Materialien wurden nach Herstellerangaben verwendet und gegebenenfalls recycelt.

UPLC/UV-Vis/MS | Alle analytischen UPLC-Trennungen der Substanzbibliothek-Mitglieder wurden am Gerät der Serie *Acquity Ultra* von *Waters* (Milford, USA) von Dr. Joachim Leistner ausgeführt. Die Anlage war ausgestattet mit einem *LCT Premier XE* Massendetektor für die UPLC-HRMS und mit einem *Alliance*®-System-Probenmanager, bestehend aus dem Separationsmodul 2695, dem Photodiodenarraydetektor 996 sowie dem Massendetektor *ZQ 2000*. Die PDA-Detektion erfolgte bei 200 - 800 nm. Als Trennsäule diente eine auf 35 °C temperierte Säule von *Waters* des Typs *XTerra MS C18*, 3.5 μm , 2.1 × 150 mm. Eluiert wurde mit dem linearen Gradienten 5→80 %, 0.1 % $\text{NH}_4\text{COO}_{\text{aq}}$ in MeOH in 8 min bei einer Flussrate von 0.4 ml min⁻¹.

88

HPLC/UV/MS | Für die analytische HPLC-Trennung mit UV- und Massenanalyse wurde eine Anlage der 1100 Serie von *Agilent* (Stuttgart) mit einem VL-Quadrupol-Massenspektrometer sowie einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm verwendet. Als Trennsäule diente eine auf 55 °C temperierte *Polaris C18 A*, 5 μm , 4.6 × 250 mm, Porengröße 220 Å der Firma *Varian* (Stuttgart). Als mobile Phase wurde ein Gemisch aus A (98.9 % H_2O , 1 % MeCN, 0.1 % HCOOH) und B (98.9 % MeCN, 1 % H_2O , 0.1 % HCOOH) verwendet. Die Flussrate betrug 0.3 ml min⁻¹. Angaben zum Gradienten finden sich bei den entsprechenden Abbildungen.

Massenspektrometrische Verfahren | Die hochaufgelöste massenspektrometrische Analyse der Substanzbibliothek-Mitglieder erfolgte durch Dipl.-Chem. Jan Falkenhagen am 6210 *Time-of-Flight* Massenspektrometer von *Agilent*. Das Gerät ist mit einem Probensampler und einer Dual-ESI-Ionenquelle ausgestattet. Als Elutionsmittel diente ein Gemisch aus MeOH und H_2O (1:1, v/v). Alle Messungen wurden bei einer Fragmentorspannung von 250 V, einer Kapillarspannung von 3500 V und unter Verwendung eines 300 °C heißen N_2 -Trocknungsgasstrom ausgeführt. Alle anderen Massenspektren wurden von Angelika Woyda in der analytischen Serviceabteilung an einem *LTQ FT Ultra*TM von *Thermo Fisher Scientific* (Waltham, USA) mit Elektronensprayionisation (ESI, +/-) aufgenommen. Im Fall einer Elektronenstoßionisation (EI) wurde das Gerät *MSI Concept 1H* von *AMD Intectra* (Harpstedt) verwendet. Alle in dieser Arbeit aufgeführten theoreti-

schen Massen wurden mit dem *MS Interpreter 2.0 Isotope Calculator* von *NIST* (Gaithersburg, USA) berechnet.^[173]

Polarimeter | Die Drehwerte wurden am *Polarimeter 241* von *Perkin Elmer* (Waltham, USA) in einer Küvette mit 10 cm Strahlengang und 1.1 ml Volumen bei $\lambda = 589$ nm bestimmt. Für die Konzentrationsangaben gilt: $c = 1.0 = 10 \text{ mg l}^{-1}$.

Elementaranalyse | Die Bestimmung des prozentualen Gehalts von C, H, N, S, P in den synthetisierten Verbindungen wurde an einem *EA3000 Elemental Analyser* der Firma *EuroVector* (Mailand, Italien) durch die Mitarbeiter der analytischen Serviceabteilung Ursula Kätel bzw. Andrea Zehl vorgenommen.

Kernmagnetische-Resonanz-Spektroskopie | NMR-Spektren wurden an einem *Avance-II-300-* oder *Avance-II-500-Gerät* von *Bruker* (Karlsruhe) in der analytischen Serviceabteilung von Angela Thiesies bzw. Katharina Pfaff aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in ppm angegeben und auf charakteristische Lösungsmittelrestsignale kalibriert.^[174] Die chemischen Verschiebungen der ^{31}P -NMR-Spektren beziehen sich auf 85%ige H_3PO_4 als externen Standard. Die Signalmultiplizitäten werden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quadruplett, m = Multiplett, dd = Dublett von Dubletts, td = Triplett von Dubletts, dq = Dublett von Quadrupletts, p = Pentett, br = verbreitertes Singulett. ^{13}C -NMR-Spektren wurden ^1H -Breitband-entkoppelt gemessen. Die Signale wurden, unterstützt durch DEPT-, APT- und 2D-NMR-Experimente zugeordnet, basierend auf der konventionellen Nummerierung in Aminoglykosiden sowie Nukleotiden bzw. -siden (Abb. 6-1). Wenn nötig, wird ein kurzer Formelausschnitt gezeigt. Aufgrund der Komplexität der Spektren war bei einigen Neamin- und 2-Desoxystreptaminderivaten keine eindeutige Zuordnung der Ringkohlenstoffatome bzw. Protonen möglich. Für symmetrische Moleküle wurden die Kohlenstoff-Signale nur einmal genannt, die Protonenintegrale sind für das vollständige Molekül aufgeführt. Die NMR-Spektren der feuchtigkeitsempfindlichen Phosphoramidite wurden zügig nach ihrer Isolierung, in wasserfreiem CDCl_3 , gemessen.

89

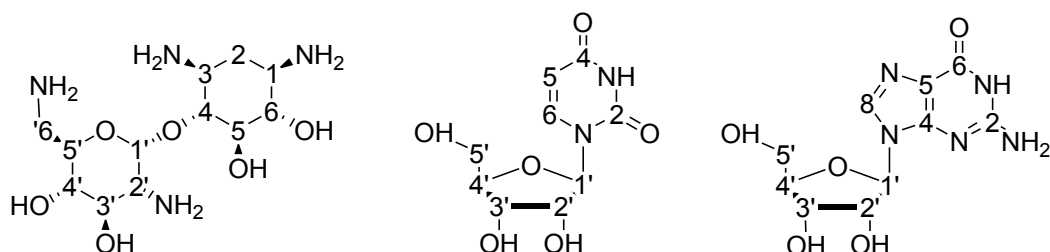


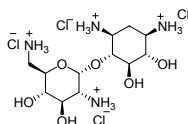
Abb. 6-1 | Nummerierung der Atome für die Zuordnung in NMR-Spektren

Zentrifuge | Die Abtrennung von Feststoffen aus Suspensionen erfolgte in der Megafuge 1.0R von *Heraeus* (Newport Pagnell, England).

6-3 | Synthesevorschriften zum Aufbau der Substanzbibliothek

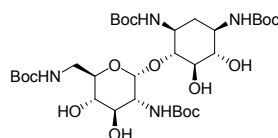
6-3.1 | Synthesevorschriften für Alkin-modifizierte 2-Desoxystreptaminderivate

Neaminhydrochlorid 35



In einem Zweihalskolben wurde Neomycinsulfat B (40.0 g, 55.0 mmol) in 1 l MeOH suspendiert. Diese Suspension wurde zum Sieden erhitzt und tropfenweise mit 31 ml konz. HCl versetzt. Nach 24 h Sieden unter Rückfluss, wurde die gelbe Lösung am Rotationsverdampfer auf ein Fünftel des Reaktionsvolumens eingengt, der dabei ausfallende Niederschlag durch Filtration isoliert und durch Koevaporation mit Toluol getrocknet. Das Filtrat wurde erneut auf ein Fünftel des Volumens eingengt und das Präzipitat aus 100 % EtOH umkristallisiert, durch Filtration separiert und ebenso durch Koevaporation mit Toluol getrocknet. Die vereinigten Niederschläge wurden abschließend im Feinvakuum getrocknet.

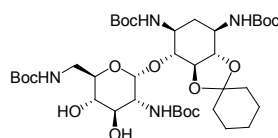
19.6 g (42.1 mmol, 96 %) cremefarbener Feststoff | $C_{12}H_{26}N_4O_6 \times 4HCl$ | $R_f = 0.30$, 45 % konz. NH_3 in MeOH | 1H -NMR (D_2O , 500 MHz): $\delta = 1.96$ (q, $J = 12.6$ Hz, 1H, H_{2ax}), 2.54 (dt, $J = 12.5$, 4.2 Hz, 1H, $H_{2\alpha q}$), 3.31 (dd, $J = 13.6$, 7.0 Hz, 1H, H_6'), 3.36 – 3.41 (m, 1H, H_1), 3.47 – 3.55 (m, 3H, H_2' , H_4' , H_6'), 3.57 – 3.66 (m, 2H, H_3 , H_6), 3.74 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H, H_5), 4.00 – 4.08 (m, 3H, H_3' , H_4 , H_5'), 5.97 (d, $J = 3.9$ Hz, 1H, $H_{1'}$) ppm | 175 ^{13}C -NMR (D_2O , 126 MHz): $\delta = 28.3$ (C2), 40.2 (C6'), 48.5 (C3), 49.8 (C1), 53.6 (C2'), 68.2 (C3'), 69.2 (C5'), 70.7 (C4'), 72.5 (C6), 75.2 (C5), 77.6 (C4), 95.9 (C1') ppm | 176 ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{12}H_{27}N_4O_6]^+$ 323.1931, gef. 323.1952 | $[\alpha]_D^{22} = +73.1$, c 1.0, H_2O , vgl. $[\alpha]_D^{22} = +86.2$, c 1.0, H_2O ^[129]

1,3,2',6'-Tetra-*N*-tert-butyloxycarbonylneamin 36

Die Verbindung **35** (17.9 g, 38.5 mmol) wurde in 120 ml 1 N NaOH-Lösung gelöst und nacheinander mit 120 ml 1,4-Dioxan und Boc_2O (55.8 g, 0.23 mol) versetzt. Die Lösung wurde 4 h refluxiert und anschließend auf 500 ml Eiswasser gegossen. Die entstandene Suspension wurde für 30 min in einem Eisbad gekühlt. Der ausgefallene farblose Niederschlag wurde durch Filtration abgetrennt und in 500 ml H_2O suspendiert. Diese Suspension wurde auf 60 °C erhitzt, filtriert und getrocknet. Der Rückstand wurde in MeOH aufgenommen und durch Filtration über Kieselgel mit MeOH als Elutionsmittel gereinigt.

19.7 g (27.2 mmol, 71 %) farbloser Feststoff | $C_{32}H_{58}N_4O_{14}$ | $R_f = 0.50$, 10 % MeOH in CH_2Cl_2 | 1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz): $\delta = 1.22 - 1.54$ (m, 37H, H_{2ax} , $tBu-CH_3$), 1.97 – 2.11 (m, 1H, $H_{2äq}$), 3.09 – 3.20 (m, 1H, H_5), 3.21 – 3.27 (m, 1H, H_4'), 3.34 – 3.60 (m, 8H, H_1 , H_3 , H_4 , H_6 , H_2' , H_3' , H_6' , H_6'), 3.69 – 3.77 (m, 1H, H_5'), 5.25 (s, 1H, $H_{1'}$) ppm | APT (CD_3OD , 126 MHz): $\delta = 3 \times 28.8$ ($tBu-CH_3$), 3×28.8 ($tBu-CH_3$), 6×28.9 ($tBu-CH_3$), 36.2 (C_2), 42.0 (C_6'), 51.0 (C_3), 52.3 (C_1), 57.0 (C_2'), 72.3 (C_5'), 72.7 (C_3'), 72.9 (C_4'), 76.5 (C_5), 78.9 (C_6), 2×80.4 ($tBu-C_q$), 2×80.7 ($tBu-C_q$), 82.1 (C_4), 100.4 (C_1'), 157.9 ($O=C_q$), 158.2 ($O=C_q$), 158.7 ($O=C_q$), 159.3 ($O=C_q$) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{32}H_{57}N_4O_{14}]^-$ 721.3872, gef. 721.3878 | $[\alpha]_D^{22} = +44.9$, c 1.0, DMF

1,3,2',6'-Tetra-*N*-*tert*-butyloxycarbonyl-5,6-*O*-cyclohexylidenneamin **38**

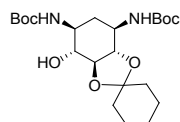


Eine Lösung aus **36** (10.3 g, 14.3 mmol), Cyclohexanondimethylketal (12.4 g, 13.0 ml, 85.8 mmol) und p -TsOH \times H₂O (0.45 g, 2.40 mmol) in 150 ml wasserfreiem DMF wurde 2 h am Rotationsverdampfer bewegt (60 °C, 40 mbar). Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von 8 ml NEt₃ gestoppt. Einengen im Vakuum lieferte ein gelbes Öl, das in 100 ml CHCl₃ aufgenommen und mit je 100 ml H₂O sowie ges. NaCl-Lösung gewaschen wurde. Die wässrigen Phasen wurden mit 2×100 ml CHCl₃ reextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Nach Entfernen aller flüchtigen Bestandteile im Vakuum blieb ein Gemisch aus einfach und zweifach cyclohexyliden-geschütztem 1,3,2',6'-Tetra-*N*-*tert*-butyloxycarbonylneamin **37** zurück. Dieses wurde in 75 ml wasserfreiem DMF gelöst und mit 5 ml wasserfreiem MeOH sowie p -TsOH \times H₂O (0.13 g, 0.70 mmol) versetzt. Der Reaktionsansatz wurde am Rotationsverdampfer bewegt (50 °C, 70 mbar) und die Reaktion nach 6 h durch Zugabe von 8 ml NEt₃ gestoppt. Unter reduziertem Druck wurde das Lösungsmittel entfernt, der Rückstand in 100 ml CHCl₃ aufgenommen und nacheinander mit je 100 ml H₂O und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit 2×100 ml CHCl₃ reextrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet. Das Rohprodukt wurde auf Kieselgel immobilisiert und säulenchromatografisch an Kieselgel mit dem Stufengradienten 10→20→50 % EtOAc in Cyclohexan gereinigt.

8.74 g (10.9 mmol, 76 %) farbloser Feststoff | $C_{38}H_{66}N_4O_{14}$ | $R_f = 0.50$, 30 % EtOAc in Cyclohexan | 1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz): $\delta = 1.47$ (d, $J = 7.0$ Hz, 39H, H_{2ax} , $tBu-CH_3$, CH₂), 1.56 – 1.71 (m, 8H, CH₂), 2.09 (dt, $J = 12.8, 4.2$ Hz, 1H, $H_{2äq}$), 3.23 – 3.27 (m, 1H, H_4'), 3.29–3.32 (m, 1H, H_6'), 3.39 – 3.44 (m, 1H, H_5), 3.48 – 3.60 (m, 4H, H_4 , H_2' , H_3' , H_6'), 3.62 – 3.74 (m, 4H, H_1 , H_3 , H_6 , H_5'), 5.25 – 5.30 (m, 1H, $H_{1'}$) ppm | ^{13}C -NMR (CD_3OD , 126 MHz): $\delta = 24.8$ (CH₂), 25.1 (CH₂), 26.2 (CH₂), 3×28.8 ($tBu-CH_3$), 3×28.9 ($tBu-CH_3$),

3 × 28.9 (*t*Bu-CH₃), 3 × 28.9 (*t*Bu-CH₃), 37.3 (CH₂), 37.5 (CH₂), 37.5 (C₂), 42.3 (C_{6'}), 49.9 (C₁), 51.8 (C₃), 56.5 (C_{2'}), 72.1 (C_{5'}), 72.6 (C_{3'}), 73.1 (C_{4'}), 77.8 (C₆), 79.7 (C₅), 80.2 (*t*Bu-C_q), 80.3 (*t*Bu-C_q), 80.5 (*t*Bu-C_q), 80.9 (*t*Bu-C_q), 82.4 (C₄), 98.0 (C_{1'}), 113.2 (O,O-C_q), 157.8 (O=C_q), 158.2 (O=C_q), 158.4 (O=C_q), 159.3 (O=C_q) ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₃₈H₆₇N₄O₁₄]⁺ 803.4654, gef. 803.4633 | $[\alpha]_D^{22} = +2.6$, *c* 1.0, CHCl₃

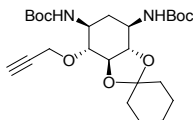
1,3-Di-*N-tert*-butyloxycarbonyl-5,6-*O*-cyclohexyliden-2-desoxystreptamin 40



1,3,2',6'-Tetra-*N-tert*-butyloxycarbonyl-5,6-*O*-cyclohexylidenneamin (4.28 g, 5.33 mmol) wurde in 190 ml MeOH gelöst und bei 0 °C mit NaIO₄ (8.55 g, 40.0 mmol) versetzt. Das Eisbad wurde entfernt, der Ansatz für 17 h kräftig gerührt und der dabei ausgefallene Niederschlag durch Filtration über Celite abgetrennt. Der Aldehyd (*R_f* = 0.44, 50 % EtOAc in Cyclohexan) wurde nachfolgend unter bestmöglichem Lichtausschluss gehandhabt. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer (< 30 °C) eingeeengt, in 300 ml EtOAc aufgenommen und mit je 200 ml H₂O und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden mit 2 × 100 ml EtOAc reextrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet, im Vakuum (< 30 °C) bis zur Trockne eingeeengt und in 260 ml MeOH gelöst. Bei RT wurde *n*-Butylamin (1.17 g, 1.58 ml, 16.0 mmol) langsam zuge-
 92 tropft. Nach 2 h wurde eine weiteres Aliquot *n*-Butylamin (1.48 g, 2.00 ml, 20.3 mmol) addiert und die Reaktion für 24 h fortgesetzt. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum (< 30 °C) entfernt, das gelbe Öl auf Kieselgel immobilisiert und säulenchromatografisch an Kieselgel mit dem Laufmittel 1 % NEt₃, 30 % EtOAc in Cyclohexan gereinigt.

1.75 g (3.96 mmol, 74 %) hellgelber Feststoff | C₂₂H₃₈N₂O₇ | *R_f* = 0.38, 1 % MeOH, 39 % EtOAc in Cyclohexan | ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ = 1.23 – 1.34 (m, 1H, H_{2ax}), 1.44 (m, 20H, *t*Bu-CH₃, CH₂), 1.58 – 1.70 (m, 8H, CH₂), 2.13 (dt, *J* = 13.2, 4.6 Hz, 1H, H_{2äq}), 3.36 – 3.47 (m, 3H, H₃, H₅, H₆), 3.50 – 3.55 (m, 1H, H₄), 3.64 – 3.71 (m, 1H, H₁) ppm | ¹³C-NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ = 2 × 24.8 (CH₂), 26.2 (CH₂), 6 × 28.8 (*t*Bu-CH₃), 37.4 (CH₂), 37.5 (CH₂), 37.5 (C₂), 50.0 (C₁), 54.5 (C₃), 74.1 (C₄), 79.8 (C₅), 80.2 (*t*Bu-C_q), 80.3 (*t*Bu-C_q), 82.2 (C₆), 112.9 (O,O-C_q), 157.7 (O=C_q), 158.2 (O=C_q) ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₂₂H₃₉N₂O₇]⁺ 443.2757, gef. 443.2753 | $[\alpha]_D^{22} = -2.6$, *c* 1.0, MeOH, $[\alpha]_D^{22} = -23.0$, *c* 1.0, CHCl₃

1,3-Di-*N*-*tert*-butyloxycarbonyl-5,6-*O*-cyclohexyliden-4-*O*-propargyl-2-desoxy-streptamin **41**

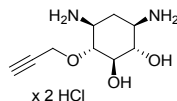


Unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre wurde **40** (744 mg, 1.68 mmol) in 12 ml wasserfreiem THF gelöst und bei 0 °C mit NaH (80.8 mg, 2.02 mmol, 60%ig in Mineralöl) versetzt. Die Lösung wurde für 1 h gerührt und vor der Addition von TBAI (100 mg, 0.27 mmol) sowie Propargylbromid (301 mg, 400 µL, 2.02 mmol, 80%ig in Toluol) erneut auf 0 °C abgekühlt. Innerhalb von 24 h wurde die Lösung auf RT gebracht und anschließend ohne Kühlung erneut TBAI (40 mg, 0.11 mmol) sowie Propargylbromid (117 mg, 155 µL, 0.79 mmol, 80%ig in Toluol) zugegeben. Nach 24 h Rühren bei RT wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 ml H₂O Reaktion gestoppt. Die Lösung wurde mit 3 × 50 ml Et₂O extrahiert und die wässrige Phase mit 2 × 50 ml Et₂O reextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in 5 % MeOH in CH₂Cl₂ aufgenommen und säulenchromatografisch an Kieselgel mit dem Laufmittel CH₂Cl₂ gereinigt.

652 mg (1.36 mmol, 81 %) glasartiger, farbloser Feststoff | C₂₅H₄₀N₂O₇ | *R_f* = 0.69, 50 % EtOAc in Cyclohexan | ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ = 1.37 – 1.50 (m, 21H, H_{2ax}, ^tBu-CH₃, CH₂), 1.58 – 1.74 (m, 8H, CH₂), 2.12 (td, *J* = 13.2, 4.6, Hz, 1H, H_{2äq}), 2.81 (t, *J* = 2.4 Hz, 1H, ≡CH), 3.36 – 3.72 (m, 5H, H₁, H₃, H₄, H₅, H₆), 4.37 (dq, *J* = 15.6, 2.4 Hz, 2H, O-CH₂) ppm | ¹³C-NMR (CD₃OD, 126 MHz): δ = 2 × 25.2 (CH₂), 26.5 (CH₂), 6 × 29.1 (^tBu-CH₃), 37.6 (CH₂), 37.7 (CH₂), 37.8 (C₂), 50.2 (C₁),* 52.8 (C₃), 59.1 (O-CH₂), 76.0 (≡CH), 3 × 80.1 (^tBu-C_q, C₅), 80.6 (C₄), 81.3 (≡C_q), 82.4 (C₆), 113.5 (O, O-C_q), 158.0 (O=C_q), 158.3 (O=C_q) ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₂₅H₄₁N₂O₇]⁺ 481.2914, gef. 481.2914 | [*α*]_D²² = + 0.7, *c* 1.0, MeOH

93

4-*O*-Propargyl-2-desoxystreptamin Hydrochlorid **42**

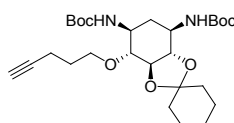


Die Verbindung **41** (0.46 g, 0.96 mmol) wurde bei 0 °C in 25 ml 4 M HCl-Lösung in 1,4-Dioxan gelöst. Nach 15 min wurde das Eisbad entfernt, das Reaktionsgemisch innerhalb von 30 min auf RT erwärmt, mit 2 ml H₂O versetzt und für weitere 10 min gerührt. Das Rohprodukt wurde unter reduziertem Druck eingengt und zur Reinigung über RP₁₈-modifiziertem CHROMABOND®-Material und mit H₂O als Elutionsmittel filtriert.

* Das Signal liegt unter dem CD₃OD-Signal.

0.26 g (0.96 mmol, > 99 %) hellbrauner Feststoff | $C_9H_{16}N_2O_3 \times 2HCl$ | $R_f = 0.32$, 7.5 % konz. NH_3 in MeOH | 1H -NMR (D_2O , 500 MHz): $\delta = 1.79$ (q, $J = 12.5$ Hz, 1H, H_{2ax}), 2.39 (dt, $J = 12.5$, 4.3 Hz, 1H, $H_{2äq}$), 2.89 (t, $J = 2.4$ Hz, 1H, $\equiv CH$), 3.19 – 3.32 (m, 2H, H_1 , H_3), 3.47 – 3.53 (m, 2H, H_4 , H_6), 3.59 (dd, $J = 10.1$, 3.8 Hz, 1H, H_5), 4.43 – 4.53 (m, 2H, O- CH_2) ppm | ^{13}C -NMR (D_2O , 126 MHz): $\delta = 27.9$ (C_2), 48.9 (C_3), 49.9 (C_1), 59.8 (O- CH_2), 72.2 (C_6), 75.2 (C_5), 76.9 ($\equiv CH$), 78.5 (C_4), 79.2 ($\equiv C_q$) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_9H_{17}N_2O_3]^+$ 201.1239, gef. 201.1234 | $[\alpha]_D^{22} = + 31.5$, c 1.0, H_2O

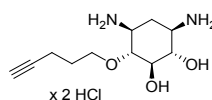
1,3-Di-*N*-tert-butyloxycarbonyl-5,6-*O*-cyclohexyliden-4-*O*-pentinyl-2-desoxystreptamin 44



In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde **40** (226 mg, 0.51 mmol) in 0.5 ml wasserfreiem THF gelöst und bei 0 °C mit NaH (24.5 mg, 0.61 mmol, 60%ig in Mineralöl) versetzt. Nach 1 h Rühren bei 0 °C wurde Pent-4-ynylmethansulfonat (110 mg, 0.91 mmol) zutropft. Ohne das Eisbad zu entfernen wurde die Reaktion für 48 h fortgesetzt, durch Zusatz von H_2O gestoppt und mit 3 \times 50 ml Et_2O extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingengt. Verunreinigungen wurden säulenchromatografisch an Kieselgel mit CH_2Cl_2 als Laufmittel entfernt.

245 mg (0.48 mmol, 94 %) hellgelber Feststoff | $C_{27}H_{44}N_2O_7$ | $R_f = 0.78$, 30 % EtOAc in Cyclohexan | 1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz): $\delta = 1.30 - 1.37$ (m, 1H, H_{2ax}), 1.44 (m, 20H, $tBu-CH_3$, CH_2), 1.58 – 1.78 (m, 10H, CH_2 , $-CH_2-$), 2.07 (dt, $J = 13.4$, 4.8 Hz, 1H, $H_{2äq}$), 2.17 (t, $J = 2.6$ Hz, 1H, $\equiv CH$), 2.21 – 2.33 (m, 2H, $\equiv -CH_2$), 3.35 (m, 1H, H_4), 3.39 (dd, $J = 9.0$, 7.4 Hz, 2H, H_5 , H_6), 3.46 – 3.55 (m, 1H, H_3), 3.63 (m, $J = 12.1$, 4.8, 1.8 Hz, 2H, H_1 , O- CHH), 3.89 (dt, $J = 9.8$, 5.7 Hz, 1H, O- CHH) ppm | ^{13}C -NMR (CD_3OD , 126 MHz): $\delta = 16.0$ ($\equiv -CH_2$), 24.8 (CH_2), 24.9 (CH_2), 26.2 (CH_2), 3 \times 28.7 ($tBu-CH_3$), 3 \times 28.8 ($tBu-CH_3$), 30.5 ($-CH_2-$), 37.3 (CH_2), 37.4 (CH_2), 37.6 (C_2), 49.5 (C_1), 52.7 (C_3), 69.4 ($\equiv CH$), 70.7 (O- CH_2), 79.8 (C_5), 80.1 ($tBu-C_q$), 80.3 ($tBu-C_q$), 82.0 (C_4), 82.3 (C_6), 84.9 ($\equiv C_q$), 112.9 (O,O- C_q), 157.7 (O= C_q), 158.0 (O= C_q) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{27}H_{45}N_2O_7]^+$ 509.3227, gef. 509.3222 | $[\alpha]_D^{22} = - 12.0$, c 1.0, MeOH

4-*O*-Pentinyl-2-desoxystreptamin Hydrochlorid 45



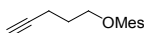
Die Substanz **40** (80.0 mg, 0.17 mmol) wurde bei 0 °C in 3.6 ml 4 M HCl-Lösung in 1,4-Dioxan gelöst. Nach 10 min Rühren wurde die Lösung innerhalb von 30 min auf RT er-

wärmt, anschließend mit 1 ml H₂O verdünnt und für weitere 10 min gerührt. Das Rohprodukt wurde unter reduziertem Druck eingeeengt und durch Filtration über RP₁₈-modifiziertem CHROMABOND®-Material und mit H₂O als Elutionsmittel gereinigt.

51.2 mg (0.15 mmol, 90 %) hellbrauner Feststoff | C₁₁H₂₀N₂O₃ × 2HCl | *R_f* = 0.46, 10 % konz. NH₃ in MeOH | ¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): δ = 1.78 – 1.94 (m, 3H, H₂_{ax}, -CH₂-), 2.29 – 2.36 (m, 2H, ≡-CH₂), 2.38 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, ≡CH), 2.47 (dt, *J* = 12.3, 4.1 Hz, 1H, H₂_{äq}), 3.28 – 3.40 (m, 2H, H1, H3), 3.44 – 3.48 (m, 1H, H4), 3.51 – 3.58 (m, 2H, H5, H6), 3.82 (dt, *J* = 9.4, 6.4 Hz, 1H, O-CHH), 4.05 (dt, *J* = 9.3, 6.6 Hz, 1H, O-CHH) ppm | ¹³C-NMR (D₂O, 126 MHz): δ = 14.4 (≡-CH₂), 28.0 (-CH₂-), 28.2 (C2), 49.2 (C3), 50.0 (C1), 69.8 (≡CH), 71.8 (O-CH₂), 72.6 (C6), 75.0 (C5), 80.4 (C4), 85.2 (≡C_q) ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₁₁H₂₁N₂O₃]⁺ 229.1552, gef. 229.1547 | [*α*]_D²² = + 4.0, *c* 1.0, H₂O

6-3.2 | Synthesevorschriften für Alkinderivate

Pent-4-inylmethansulfonat



In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde 4-Pentanol (0.91 g, 1.00 ml, 10.8 mmol) mit 9 ml wasserfreiem CH₂Cl₂ und 16 ml wasserfreiem NEt₃ verdünnt. Bei – 78 °C wurde über einen Zeitraum von 30 min Methansulfonylchlorid (1.70 g, 1.14 ml, 14.8 mmol), verdünnt in 4 ml wasserfreiem CH₂Cl₂, zugesetzt. Die Reaktion wurde auf RT erwärmt, für 20 h gerührt und anschließend auf 150 ml Eiswasser gegossen. Die organische Phase wurde mit 50 ml H₂O sowie 20 ml 1 M wässriger HCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und unter reduziertem Druck zu einem gelben Öl eingeeengt, welches säulenchromatografisch an Kieselgel mit dem Stufengradienten 0→10→20→30→40 % EtOAc in Cyclohexan gereinigt wurde.

95

1.97 g (10.7, 99 %) hellgelbes Öl | C₆H₁₀O₃S | *R_f* = 0.66, CH₂Cl₂ | ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1.93 – 2.00 (m, 2H, -CH₂-), 2.01 (t, *J* = 2.7 Hz, 1H, ≡CH), 2.37 (td, *J* = 6.8, 2.7 Hz, 2H, ≡-CH₂), 3.03 (s, 3H, CH₃), 4.36 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, O-CH₂) ppm | ¹³C-NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ = 14.7 (≡-CH₂), 27.8 (-CH₂-), 37.3 (CH₃), 68.2 (O-CH₂), 69.8 (≡CH), 82.1 (≡C_q) ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₆H₁₀O₃SN_a]⁺ 185.0248, gef. 185.0242

Pent-4-ynyl-*p*-toluensulfonat^[177]

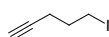


Eine auf – 30 °C gekühlte Lösung aus TosCl (4.98 g, 26.2 mmol) und 4-Pentanol (1.76 g, 1.95 ml, 20.9 mmol) in 18 ml wasserfreiem Et₂O wurde über 25 min mit kleinen Portionen frisch gemörsertem KOH (7.32 g, 131 mmol) versetzt, sodass die Reaktionstemperatur – 10 °C nicht überschritt. Nach beendeter Zugabe wurde für 1.5 h bei 0 °C gerührt

und die Lösung anschließend auf 50 ml Eiswasser gegossen. Die wässrige Phase wurde mit 3 × 50 ml Et₂O extrahiert, die vereinigten Extrakte über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt.

7.34 g (18.2 mmol, 87 %) hellgelbes Öl | C₁₂H₁₄O₃S | *R_f* = 0.69, CH₂Cl₂ | ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1.83 – 1.90 (m, 3H, -CH₂-, ≡CH), 2.26 (td, *J* = 6.9, 2.6 Hz, 2H, ≡-CH₂), 2.45 (s, 3H, CH₃), 4.14 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H, O-CH₂), 7.35 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar-CH), 7.80 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-CH) ppm | ¹³C-NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ = 14.7 (≡-CH₂), 21.6 (CH₃), 27.7 (-CH₂-), 68.7 (O-CH₂), 69.4 (≡CH), 82.1 (≡C_q), 127.9 (Ar-CH), 129.8 (Ar-CH), 132.9 (Ar-C_q), 144.8 (Ar-C_q) ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₁₂H₁₄O₃SNa]⁺ 261.0561, gef. 261.0556

Pent-4-inyliodid

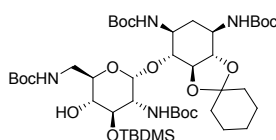


Pent-4-ynyl-*p*-toluensulfonat (1.88 g, 7.89 mmol) wurde in 18.5 ml Aceton gelöst und mit Natriumiodid (2.84 g, 18.9 mmol) versetzt. Nach 60 min Rühren bei 70 °C wurde die gelbe Suspension auf 150 ml Et₂O und Eiswasser (2:1, v/v) gegossen. Die wässrige Phase wurde mit 3 × 100 ml Et₂O extrahiert und die vereinigten Extrakte mit je 20 ml ges. NaHCO₃- und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter reduziertem Druck entfernt.

1.37 g (7.05 mmol, 89 %) hellgelbes Öl | C₅H₇I | *R_f* = n. b., nicht detektier- und anfärbbar | ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 1.95 – 2.05 (m, 3H, ≡CH, ≡-CH₂), 2.33 (dd, *J* = 6.6, 2.7 Hz, 2H, -CH₂-), 3.31 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H, I-CH₂) ppm | ¹³C-NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ = 5.1 (I-CH₂), 19.4 (≡-CH₂), 31.8 (-CH₂-), 69.4 (≡CH), 82.2 (≡C_q) ppm | EI-HRMS *m/z* ber. für [C₅H₇I]⁺ 193.9593, gef. 193.9592

6-3.3 | Synthesevorschriften für Alkin-modifizierte Neaminderivate

3'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-1,3,2',6'-tetra-*N*-*tert*-butyloxycarbonyl-5,6-*O*-cyclohexylidenneamin 46



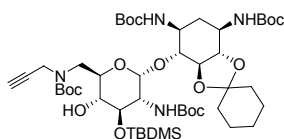
In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde **38** (3.00 g, 3.74 mmol) in 35 ml wasserfreiem DMF vorgelegt und mit Imidazol (0.33 g, 4.86 mmol) und TBDMS-Cl (0.68 g, 4.49 mmol) versetzt. Nach 24 h Rühren bei RT wurde erneut TBDMS-Cl (0.11 g, 0.75 mmol) addiert und die Reaktion 4 h später durch die Zugabe von 100 ml H₂O gestoppt. Es wurde mit 3 × 100 ml CH₂Cl₂ extrahiert und die vereinigten Extrakte mit je

50 ml H₂O und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Trocknen über Na₂SO₄ und Entfernen des Lösungsmittels unter reduziertem Druck lieferte ein Rohprodukt, das durch Säulenchromatografie an Kieselgel unter Verwendung des Stufengradienten 10→20→30 % EtOAc in Cyclohexan gereinigt wurde.

2.33 g (2.55 mmol, 68 %) farbloser Feststoff | C₄₄H₈₀N₄O₁₄Si | *R_f* = 0.61, 40 % EtOAc in Cyclohexan | ¹H-NMR (CD₃CN, 500 MHz): δ = 0.05 (s, 6H, Si-CH₃), 0.85 (s, 9H, ^tBuSi-CH₃), 1.25 – 1.47 (m, 39H, H_{2ax}, ^tBu-CH₃, CH₂), 1.47 – 1.69 (m, 8H, CH₂), 2.06 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H, H_{2äq}), 3.06 – 3.16 (m, 1H, H_{4'}), 3.21 (d, *J* = 13.7 Hz, 1H, H_{6'}), 3.33 – 3.39 (m, 1H, H₅), 3.45 – 3.53 (m, 1H, H_{6'}), 3.53 – 3.58 (m, 3H, H₄, H_{2'}, H_{3'}), 3.59 – 3.66 (m, 2H, H₃, H₆), 3.66 – 3.73 (m, 2H, H₁, H_{5'}), 3.99 (s, 1H, 4'OH), 4.99 (br, 1H, H_{1'}), 5.15 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, 2'NH), 5.33 (br, 1H, 3NH), 5.43 (br, 1H, 1NH), 5.63 (br, 1H, 6'NH) ppm | ¹³C-NMR (CD₃CN, 126 MHz): δ = – 5.6 (Si-CH₃), – 4.8 (Si-CH₃), 17.8 (^tBuSi-C_q), 23.5 (CH₂), 23.7 (CH₂), 24.5 (CH₂), 3 × 25.3 (^tBuSi-CH₃), 6 × 27.5 (^tBu-CH₃), 3 × 27.6 (^tBu-CH₃), 3 × 27.7 (^tBu-CH₃), 35.9 (CH₂), 36.0 (CH₂), 36.4 (C₂), 40.8 (C_{6'}), 48.3 (C₁), 50.5 (C₃), 55.2 (C_{2'}), 71.1 (C_{5'}), 71.7 (C_{4'}), 72.6 (C_{3'}), 77.1 (C₆), 77.9 (C₅), 78.2 (^tBu-C_q), 78.5 (^tBu-C_q), 78.6 (^tBu-C_q), 79.0 (^tBu-C_q), 80.4 (C₄), 97.6 (C_{1'}), 111.5 (O,O-C_q), 154.9 (O=C_q), 155.0 (O=C_q), 155.3 (O=C_q), 157.6 (O=C_q) ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₄₄H₈₀N₄O₁₄SiNa]⁺ 939.5338, gef. 939.5327

3'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-1,3,2',6'-tetra-*N*-*tert*-butyloxy-carbonyl-5,6-*O*-cyclohexylen-6'-*N*-propargylneamin **47**

97

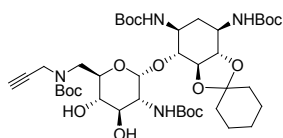


In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde **46** (5.11 g, 5.78 mmol) in 100 ml wasserfreiem THF gelöst, die Lösung auf 0 °C gekühlt und mit NaH (0.46 g, 11.6 mmol, 60%ig in Mineralöl) versetzt. Nach 5 min wurde die Lösung innerhalb von 1 h auf RT erwärmt. Danach wurden TBAI (0.21 g, 0.58 mmol) und Propargylbromid (1.72 g, 1.25 ml, 11.6 mmol, 80%ig in Toluol) zugegeben und die Reaktion nach 26 h durch Zugabe von 40 ml H₂O gestoppt. Anschließend wurde die wässrige Phase mit 3 × 200 ml Et₂O extrahiert, die organische Phase über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde säulenchromatografisch an Kieselgel mit dem Stufengradienten 0→10→15 % EtOAc in Cyclohexan gereinigt.

1.59 g (1.67 mmol, 29 %) farbloser Feststoff | C₄₇H₈₂N₄O₁₄Si | *R_f* = 0.36, 25 % EtOAc in Cyclohexan | ¹H-NMR (CD₃CN, 500 MHz): δ = 0.05 (s, 6H, Si-CH₃), 0.85 (s, 9H, ^tBuSi-CH₃), 1.29 (m, 1H, H_{2ax}), 1.32 – 1.52 (m, 38H, ^tBu-CH₃, CH₂), 1.62 (m, 8H, CH₂), 2.01 – 2.09 (m, 1H, H_{2äq}), 2.50 (s, 1H, ≡CH), 3.04 – 3.18 (m, 1H, H_{4'}), 3.18 – 3.24 (m, 1H, H_{6'}), 3.34 – 3.45 (m, 1H, H₅), 3.51 – 3.72 (m, 6H, H₁, H₃, H₄, H₆, H_{2'}, H_{3'}), 3.74 – 3.79 (m, 1H, H_{5'}), 3.85 – 4.02 (m, 2H, H_{6'}, N-CHH), 4.14 – 4.28 (m, 1H, N-CHH), 4.35 (s, 4'OH), 4.92 – 5.06

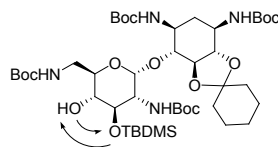
(d, $J = 12.0$ Hz, 1H, H1'), 5.15 (s, 2'NH), 5.26 – 5.48 (m, 1NH, 3NH) ppm | ^{13}C -NMR (CD₃CN, 126 MHz): $\delta = 2 \times -3.9$ (Si-CH₃), 18.8 (*t*BuSi-C_q), 24.4 (CH₂), 24.6 (CH₂), 25.4 (CH₂), 3×26.2 (*t*BuSi-CH₃), 3×28.2 (*t*Bu-CH₃), 3×28.3 (*t*Bu-CH₃), 3×28.4 (*t*Bu-CH₃), 3×28.6 (*t*Bu-CH₃), 36.8 (CH₂), 36.9 (CH₂), 37.4 (C2), 39.4 (N-CH₂), 47.4 (C6'), 49.2 (C1), 51.4 (C3), 56.0 (C2'), 72.1 ($\equiv\text{CH}$), 72.5 (C4'), 73.2 (C5'), 73.3 (C3'), 78.1 (C6), 78.9 (C5), 79.1 (*t*Bu-C_q), 79.4 (*t*Bu-C_q), 79.4 (*t*Bu-C_q), 79.5 (*t*Bu-C_q), 81.3 ($\equiv\text{C}_q$), 81.9 (C4), 98.6 (C1'), 112.4 (O,O-C_q), 2×155.9 (O=C_q), 2×156.2 (O=C_q) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für [C₄₇H₈₂N₄O₁₄SiNa]⁺ 977.5494, gef. 977.5490

1,3,2',6'-Tetra-*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-5,6-*O*-cyclohexyliden-6'-*N*-propargylneamin 48



Für die Entfernung der Silylschutzgruppe wurde in einer Argon-Schutzgasatmosphäre **47** (1.88 g, 1.97 mmol) in 35 ml wasserfreiem THF vorgelegt und TBAF-Lösung (1.78 g, 1.97 ml, 1.97 mmol, 1 M in THF) addiert. Nach 12 h Rühren bei RT wurde erneut TBAF-Lösung (189 mg, 220 μl , 0.22 mmol, 1 M in THF) zugetropft und die Lösung für weitere 24 h gerührt. Nach Feststellung des vollständigen Eduktumsatzes per DC wurde das Reaktionsgemisch im Vakuum eingengt. Die Abtrennung des *N*-propargylierten Derivats erfolgte säulenchromatografisch an Kieselgel mit dem Elutionsmittel 1 % MeOH in CH₂Cl₂.

735 mg (0.87 mmol, 44 %) farbloser Feststoff | C₄₁H₆₈N₄O₁₄ | $R_f = 0.18$, 2.5 % MeOH in CH₂Cl₂ | ^1H -NMR (CD₃CN, 500 MHz): $\delta = 1.31 - 1.37$ (m, 1H, H2_{ax}), 1.38 – 1.53 (m, 38H, *t*Bu-CH₃, CH₂), 1.55 – 1.68 (m, 8H, CH₂), 2.06 – 2.12 (m, 1H, H2_{äq}), 2.52 (s, 1H, $\equiv\text{CH}$), 3.15 – 3.25 (m, 1H, H4'), 3.32 – 3.44 (m, 3H, H5, H6', 3'OH), 3.45 – 3.52 (m, 1H, H3'), 3.52 – 3.61 (m, 2H, H4, H2'), 3.62 – 3.78 (m, 4H, H1, H3, H6, H5'), 3.86 (s, 1H, H6'), 3.99 – 4.09 (m, 1H, N-CHH), 4.14 – 4.29 (m, 2H, N-CHH, 4'OH), 5.08 (s, 1H, H1'), 5.26 (d, $J = 9.0$ Hz, 2'NH), 5.43 (s, 1NH, 3NH) ppm | ^{13}C -NMR (CD₃CN, 126 MHz): $\delta = 24.5$ (CH₂), 24.7 (CH₂), 25.6 (CH₂), 3×28.5 (*t*Bu-CH₃), 3×28.5 (*t*Bu-CH₃), 3×28.6 (*t*Bu-CH₃), 3×28.7 (*t*Bu-CH₃), 36.9 (CH₂), 37.1 (CH₂), 37.4 (C2), 39.3 (N-CH₂), 47.8 (C6'), 49.4 (C1), 51.5 (C3), 55.8 (C2'), 72.3 ($\equiv\text{CH}$), 72.5 (C3'), 72.6 (C4'), 72.9 (C5'), 78.1 (C6), 79.0 (C5), 2×79.6 (*t*Bu-C_q), 2×79.7 (*t*Bu-C_q), 81.4 ($\equiv\text{C}_q$), 81.9 (C4), 98.5 (C1'), 112.6 (O,O-C_q), 156.0 (O=C_q), 156.2 (O=C_q), 156.9 (O=C_q), 157.0 (O=C_q) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für [C₄₁H₆₉N₄O₁₄]⁺ 841.4810, gef. 841.4807

CsOH-Methode mit 3'→4'-O-Silylwanderung zwischen 46 und 46'

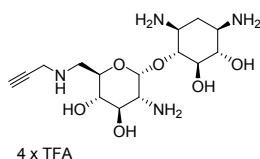
In einer Argon-Schutzgasatmosphäre wurde aktiviertes Molekularsieb (200 mg, 4 Å, Pulver) zusammen mit im Feinvakuum getrocknetem CsOH (128 mg, 0.75 mmol) in 3 ml wasserfreiem DMF/MeCN/THF suspendiert. Nach 10 min Rühren bei RT wurde **46** (685 mg, 0.75 mmol) zugegeben, nach weiteren 30 min TBAI (277 mg, 0.75 mmol) und nach weiteren 5 min Propargylbromid (122 mg, 88.5 µl, 0.82 mmol, 80%ig in Toluol). Der Reaktionsansatz wurde für 3 d bei RT gerührt und trotz unvollständigem Eduktumsatz durch die Zugabe von 2 ml H₂O beendet. Die wässrige Phase wurde mit 3 × 10 ml Et₂O extrahiert, die Extrakte mit je 10 ml H₂O und ges. NaCl-Lösung gewaschen und im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Bei der säulenchromatografischen Reinigung an Kieselgel mit dem Stufengradienten 10→15→100 % EtOAc in Cyclohexan wurden **46** und **46'** voneinander getrennt.

46 | 556 mg (0.58 mmol, 78 %) farbloser Feststoff | ¹H-NMR-, ¹³C-NMR-, DC-, MS-Daten stimmten überein mit den zuvor genannten Werten

46' | 78 mg (0.09 mmol, 11 %) | C₄₄H₈₀N₄O₁₄Si | R_f = 0.23, 20 % EtOAc in Cyclohexan | ¹H-NMR (CD₃CN, 500 MHz): δ = 0.10 (s, 6H, Si-CH₃), 0.88 (s, 9H, ^tBuSi-CH₃), 1.30 – 1.48 (m, 39H, H_{2ax}, ^tBu-CH₃, CH₂), 1.62 (s, 8H, CH₂), 2.02 – 2.10 (m, 1H, H_{2äq}), 3.23 (d, J = 5.6 Hz, 1H, H6'), 3.32 – 3.45 (m, 4H, H5, H3', H4', H6'), 3.45 – 3.50 (m, 1H, H4), 3.51 – 3.73 (m, 6H, H1, H3, H6, H2', H5', 3'OH), 5.05 (s, 1H, H1'), 5.25 – 5.55 (m, 3H, * 1NH, 3NH, 2'NH, 6'NH), 5.48 (s, 1H) ppm | ¹³C-NMR (CD₃CN, 126 MHz): δ = – 4.8 (Si-CH₃), – 3.6 (Si-CH₃), 18.9 (^tBuSi-C_q), 24.4 (CH₂), 24.6 (CH₂), 25.5 (CH₂), 26.5 (^tBuSi-CH₃), 3 × 28.4 (^tBu-CH₃), 3 × 28.5 (^tBu-CH₃), 3 × 28.6 (^tBu-CH₃), 3 × 28.6 (^tBu-CH₃), 36.8 (CH₂), 36.9 (CH₂), 37.3 (C2), 42.3 (C6'), 49.2 (C1), 51.4 (C3), 56.1 (C2'), 71.6 (C5'), 73.8 (C3'/4'), 74.2 (C3'/4'), 78.4 (C6), 78.8 (C5), 79.1 (^tBu-C_q), 79.4 (^tBu-C_q), 79.7 (^tBu-C_q), 79.7 (^tBu-C_q), 81.3 (C4), 97.9 (C1'), 112.6 (O,C-C_q), 155.9 (O=C_q), 156.1 (O=C_q), 156.7 (O=C_q), 157.2 (O=C_q) ppm | ESI-MS m/z ber. für [C₄₄H₈₀N₄O₁₄SiNa]⁺ 940.2, gef. 939.5

99

* Im ¹H-NMR-Spektrum ist das Integral infolge eines Austausch mit H₂O zu klein.

6'-N-Propargylneamin als Trifluoressigsäuresalz 49

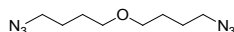
Das Edukt **48** (0.52 g, 0.62 mmol) wird in 9.5 ml eines Gemisches aus H₂O und CH₂Cl₂ (3:7, v/v) gelöst und unter Eisbadkühlung mit 3.5 ml TFA versetzt. Nach 30 min bei 0 °C wird die Lösung am Rotationsverdampfer eingeeengt und über RP₁₈-modifizierten CHROMABOND®-Säulen und mit H₂O als Elutionsmittel filtriert.

0.55 g (0.67 mmol, > 99 %) farbloser Feststoff | C₁₅H₂₈N₄O₆ × 4TFA | *R_f* = 0.51, 30 % konz. NH₃ in MeOH | ¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): δ = 1.93 (q, *J* = 12.6 Hz, 1H, H2_{ax}), 2.53 (dt, *J* = 12.6, 4.2 Hz, 1H, H2_{eq}), 3.05 (t, *J* = 2.5 Hz, 1H, ≡CH), 3.37 (ddd, *J* = 12.4, 10.3, 4.4 Hz, 1H, H1), 3.45 – 3.65 (m, 6H, H3, H6, H2', H4', 2 × H6'), 3.73 (t, *J* = 9.3 Hz, 1H, H5), 3.98 – 4.04 (m, 4H, H3', H4, N-CH₂), 4.08 – 4.12 (td, *J* = 7.1, 3.6 Hz, 1H, H5'), 5.95 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, H1') ppm | ¹³C-NMR (D₂O, 126 MHz): δ = 28.5 (C2), 37.3 (N-CH₂), 47.3 (C6'), 48.4 (C3), 49.7 (C1), 53.5 (C2'), 68.2 (C3'), 69.0 (C5'), 70.9, (C4'), 72.5 (C6), 73.1 (≡CH), 75.2 (C5), 77.8 (C4), 78.4 (≡C_q), 96.0 (C1') ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₁₅H₂₉N₄O₆]⁺ 361.2087, gef. 361.2056

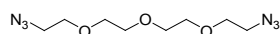
100

6-3.4 | Synthesevorschriften für die Bisazide

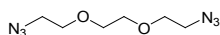
Allgemeine Synthesevorschrift für die Bisazide A1 bis A3 | In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde das entsprechende Ethylenglykoldichlorid (1 Äq., mmol-Maßstab) mit DMF (0.1 M) verdünnt, NaN₃ (3 Äq.) sowie eine Spatelspitze Dicyclohexano-18-Krone-6 zugesetzt und die Lösung für 48 h bei 60 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde mit einer dem Reaktionsvolumen äquivalenten Wassermenge aufgefüllt und mit 3 × 50 ml Et₂O extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden anschließend 3 × mit H₂O und 1 × mit ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Eine säulenchromatografische Reinigung war nicht nötig.

Bis(4-azidobutyl)ether A1

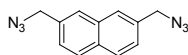
0.31 g (1.45 mmol, 58 %) farbloses Öl | C₈H₁₆N₆O | ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 1.47 – 1.63 (m, 8H, -CH₂-), 3.26 – 3.42 (m, 8H, N₃-CH₂, O-CH₂) ppm | ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 126 MHz): δ = 25.2 (-CH₂-), 26.3 (-CH₂-), 50.5 (N₃-CH₂), 69.3 (O-CH₂) ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₈H₁₇N₆O]⁺ 213.1464, gef. 213.1459

Bis(2-(2-azidoethoxy)ethyl)ether A2

0.61 g (2.45 mmol, 57 %) hellgelbes Öl | $C_8H_{16}N_6O_3$ | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 3.37 – 3.40 (m, 4H, N_3 -CH $_2$), 3.53 – 3.58 (m, 8H, O-CH $_2$), 3.59 – 3.61 (m, 4H, O-CH $_2$) ppm | ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 126 MHz): δ = 50.1 (N_3 -CH $_2$), 69.3 (O-CH $_2$), 69.7 (O-CH $_2$), 69.9 (O-CH $_2$) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_8H_{17}N_6O_3]^+$ 245.1362, gef. 245.1358

1,2-Bis-(azidoethoxy)-ethan A3

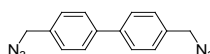
0.87 g (4.33 mmol, 81 %) hellgelbes Öl | $C_6H_{12}N_6O_2$ | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 3.38 – 3.42 (m, 4H, N_3 -CH $_2$), 3.59 (s, 4H, O-CH $_2$), 3.60 – 3.64 (m, 4H, O-CH $_2$) ppm | ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 126 MHz): δ = 49.9 (N_3 -CH $_2$), 69.2 (O-CH $_2$), 69.6 (O-CH $_2$) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_6H_{13}N_6O_2]^+$ 201.1100, gef. 201.1095

2,7-Bis(azidomethyl)naphthalin A4

Unter Schlenkbedingungen wurde 2,7-Bis(bromomethyl)naphthalin (0.35 g, 1.56 mmol) in 25 ml wasserfreiem DMF gelöst und nacheinander NaN_3 (0.22 g, 3.34 mmol) und einer Spatelspitze Dicyclohexano-18-Krone-6 zugesetzt. Nach 48 h Rühren bei 60 °C wurde die Lösung mit 50 ml Et_2O verdünnt, mit 4 × 20 ml H_2O sowie 20 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum bis zur Trockne eingengt.

101

0.21 g (0.87 mmol, 56 %) cremefarbener Feststoff | $C_{12}H_{10}N_6$ | R_f = 0.05, Cyclohexan | 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ = 4.52 (s, 4H, N_3 -CH $_2$), 7.45 (dd, J = 8.5, 1.7 Hz, 2H, Ar-CH), 7.78 (s, 2H, Ar-CH), 7.88 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ar-CH) ppm | ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 126 MHz): δ = 54.9 (N_3 -CH $_2$), 126.4 (Ar-CH), 127.2 (Ar-CH), 128.7 (Ar-CH), 132.7 (Ar- C_q), 133.1 (Ar- C_q), 133.6 (Ar- C_q) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{12}H_{11}N_6]^+$ 239.1045, gef. 239.1044

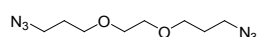
4,4'-Bis(azidomethyl)-1,1'-biphenyl A5

Eine Lösung aus Bis(chloromethyl)-1,1'-biphenyl (1.00 g, 3.98 mmol) in 15 ml wasserfreiem DMF wurde mit NaN_3 (0.67 g, 10.4 mmol) sowie einer Spatelspitze Dicyclohexano-18-Krone-6 versetzt und für 48 h bei 60 °C gerührt. Danach wurde die Lösung mit

50 ml Et₂O verdünnt, mit 3 × 50 ml H₂O gewaschen und über Na₂SO₄ getrocknet. Abschließend wurde die organische Phase im Vakuum eingeeengt.

1.05 g (3.97 mmol, > 99 %) farbloser Feststoff | C₁₄H₁₂N₆ | *R_f* = 0.35, 10 % EtOAc in Cyclohexan | ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 4.49 (s, 4H, N₃-CH₂), 7.46 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H, Ar-CH), 7.71 (d, *J* = 8.3 Hz, 4H, Ar-CH) ppm | ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 126 MHz): δ = 53.2 (N₃-CH₂), 126.8 (Ar-CH), 128.9 (Ar-CH), 134.9 (Ar-C_q), 139.3 (Ar-C_q) ppm | EI-HRMS *m/z* ber. für [C₁₄H₁₂N₆]⁺ 264.1123, gef. 264.1123

Bis(3-azidopropyl)ether A6

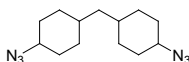


Bei 0 °C wurde eine Suspension aus NaN₃ (0.54 g, 8.23 mmol) in 10 ml wasserfreiem MeCN über 5 min mit Tf₂O (1.92 g, 1.13 ml, 6.81 mmol) versetzt und die Reaktionslösung für 2 h bei 0 °C gerührt. Anschließend wurde die Lösung filtriert. Das Filtrat wurde danach bei 0 °C tropfenweise zu Bis(3-aminopropyl)ether (0.50 g, 2.84 mmol) addiert, welches zuvor in 5 ml wasserfreiem MeCN gelöst und mit CuSO₄ (9.10 mg, 0.06 mmol) und NEt₃ (1.15 g, 1.58 ml, 11.4 mmol) versetzt wurde. Das Eisbad wurde nach 10 min entfernt und die Lösung innerhalb von 12 h auf RT erwärmt, im Vakuum aufkonzentriert und säulenchromatografisch an Kieselgel mit dem Laufmittel 50 % EtOAc in Cyclohexan gereinigt.

102

0.15 g (0.60 mmol, 21 %) hellgelbes Öl | C₈H₁₆N₆O₂ | ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 1.75 (p, *J* = 6.5 Hz, 4H, -CH₂-), 3.38 (t, *J* = 6.7 Hz, 4H, N₃-CH₂), 3.46 (t, *J* = 6.2 Hz, 4H, O-CH₂), 3.50 (s, 4H, O-CH₂) ppm | ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 126 MHz): δ = 28.5 (-CH₂-), 47.8 (N₃-CH₂), 67.1 (O-CH₂), 69.4 (O-CH₂) ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₈H₁₆N₆O₂Na]⁺ 251.1233, gef. 251.1228

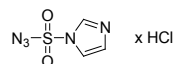
cis/trans-1,4-Bis(azidocyclohexyl)methan A7



Zu einer Lösung aus 1,4-Bis(aminocyclohexyl)methan (1.00 g, 4.76 mmol), CuSO₄ × 5H₂O (23.7 mg, 95.2 μmol) und K₂CO₃ (1.91 g, 13.8 mmol) in 25 ml MeOH wurde Imidazol-1-sulfonyl-azid Hydrochlorid **40** (2.38 g, 11.6 mmol) gegeben. Nach 24 h Rühren bei RT wurde die Lösung auf ein Drittel eingeeengt, mit 60 ml H₂O verdünnt, mit konz. HCl angesäuert und die wässrige Phase mit 10 × 50 ml EtOAc extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden im Vakuum eingeeengt und säulenchromatografisch an Kieselgel mit dem Stufengradienten 10→30→50→70 % EtOAc in Cyclohexan gereinigt.

0.94 g (3.59 mmol, 75 %) gelbes Öl | $C_{13}H_{22}N_6$ | $R_f = 0.88$, 50 % EtOAc in Cyclohexan | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz)*: $\delta = 0.90$ (d, $J = 12.2$ Hz, 4H, CH_2), 0.99 – 1.06 (m, 2H, CH_2), 1.20 – 1.31 (m, 6H, CH, CH_2), 1.71 (d, $J = 13.8$ Hz, 4H, CH_2), 1.90 (d, $J = 10.8$ Hz, 4H, CH_2), 3.27 – 3.36 (m, 2H, N_3 -CH) ppm | ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 126 MHz): $\delta = 31.0$ (CH_2), 31.1 (CH_2), 32.9 (CH), 43.2 (CH_2), 59.7 (N_3 -CH) ppm | EI-MS m/z ber. für $[C_{13}H_{22}N_6]^+$ 262.4, gef. 262.2

Imidazol-1-sulfonylazid Hydrochlorid 53^[142]



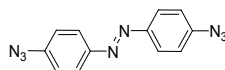
Zu einer Suspension aus NaN_3 (26.0 g, 0.40 mol) in 400 ml MeCN wurde bei 0 °C langsam Sulfurylchlorid (55.1 g, 33.0 ml, 0.41 mol) addiert. Nach 22 h Rühren bei RT wurde die Reaktionslösung auf 0 °C abgekühlt, portionsweise mit Imidazol (54.5 g, 0.80 mol) versetzt und weitere 24 h bei RT gerührt. Die Suspension wurde mit 500 ml EtOAc verdünnt und mit je 3 × 250 ml H_2O sowie ges. $NaHCO_3$ -Lösung gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck auf die Hälfte des Volumens eingeeengt. Zur Herstellung der ethanolischen HCl-Lösung wurden 150 ml wasserfreies EtOH vorgelegt und bei 0 °C tropfenweise mit 45 ml $AcCl$ versetzt. Die ethanolische HCl-Lösung wurde bei 0 °C und unter kräftigem Rühren zur Imidazol-1-sulfonylazid-Lösung getropft und der ausfallende Niederschlag durch Filtration abgetrennt. Der Feststoff wurde mit 200 ml kaltem EtOAc gewaschen und abschließend im Vakuum getrocknet.

103

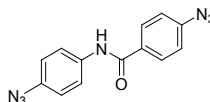
60.2 g (0.29 mol, 72 %) farbloser Feststoff | $C_3H_3N_5O_2S$ | $R_f = 0.64$, 20 % konz. NH_3 in MeOH | 1H -NMR (D_2O , 400 MHz): $\delta = 7.65$ (d, $J = 1.2$ Hz, 1H, =CH), 8.06 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, =CH), 9.49 (s, 1H, =CH) | ^{13}C -NMR (D_2O , 100 MHz): $\delta = 118.9$ (=CH), 123.0 (=CH), 137.7 (=CH) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_3H_4N_5O_2S]^+$ 174.0086, gef. 174.0074

Allgemeine Synthesevorschrift für die Bisazide A8 bis A20 ^[144] In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde das jeweilige Diamin (1 Äq., mmol-Maßstab, 0.45 M in MeCN) vorgelegt und nach Abkühlen auf 0 °C tropfenweise mit *tert*-Butylnitrit (3 Äq.) und Trimethylsilylazid (2.5 Äq.) versetzt. Das Eisbad wurde anschließend entfernt. Der Reaktionsverlauf wurde mit DC verfolgt: War das Diamin nach 3 h noch nicht vollständig umgesetzt, wurden erneut *tert*-Butylnitrit (3 Äq.) und Trimethylsilylazid (2.5 Äq.) bei 0 °C addiert. Die Reaktionslösung wurde langsam auf RT erwärmt und für weitere 12 h gerührt. Anschließend wurde das Rohprodukt säulenchromatografisch an Kieselgel gereinigt.

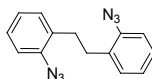
* Die isolierte Verbindung **A7** enthält zusätzlich Verunreinigung, die bereits im Edukt enthalten waren.

4,4'-Diazidoazobenzen A8

56.5 mg (0.21 mmol, 91 %) orangener Feststoff | $C_{12}H_8N_8$ | $R_f = 0.77$, 20 % EtOAc in Cyclohexan | Säulenchromatografie (SiO_2): 20 % Cyclohexan in EtOAc, Synthese, Aufarbeitung und Reinigung unter bestmöglichem Lichtausschluss | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): $\delta = 7.29 - 7.39$ (m, 4H, Ar-CH), 7.90 – 7.99 (m, 4H, Ar-CH) ppm | ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 126 MHz): $\delta = 119.9$ (Ar-CH), 124.2 (Ar-CH), 142.3 (Ar- C_q), 148.8 (Ar- C_q) ppm | EI-HRMS m/z ber. für $[C_{12}H_8N_8]^+$ 264.0872, gef. 264.0872

4-Azido-N-(4'-azidophenyl)benzamid A9

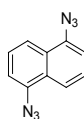
0.39 g (1.40 mmol, 64 %) hellbrauner Feststoff | $C_{13}H_9N_7O$ | $R_f = 0.84$, 50 % EtOAc in Cyclohexan | Reinigung: Bis zur Trockne eingengt, Rückstand mit 1 % MeOH in CH_2Cl_2 gewaschen, filtriert, Feststoff getrocknet | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 300 MHz): $\delta = 7.09 - 7.17$ (m, 2H, Ar-CH), 7.23 – 7.31 (m, 2H, Ar-CH), 7.80 – 7.88 (m, 2H, Ar-CH), 8.00 – 8.06 (m, 2H, Ar-CH), 10.32 (s, 1H, NH) ppm | ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 126 MHz): $\delta = 119.0$ (Ar-CH), 119.3 (Ar-CH), 121.9 (Ar-CH), 129.7 (Ar-CH), 131.2 (Ar- C_q), 134.3 (Ar- C_q), 136.5 (Ar- C_q), 142.8 (Ar- C_q), 164.4 (O= C_q) ppm | EI-HRMS m/z ber. für $[C_{13}H_9N_7O]^+$ 279.0869 , gef. 279.0869

2,2'-Diazidobibenzyl A10

0.63 g (2.40 mmol, 98 %) brauner Feststoff | $C_{14}H_{12}N_6$ | $R_f = 0.38$, 50 % EtOAc in Cyclohexan | Säulenchromatografie (SiO_2): 1 % MeOH in CH_2Cl_2 | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): $\delta = 2.77$ (s, 4H, CH_2), 7.06 – 7.10 (m, 2H, Ar-CH), 7.17 (dd, $J = 7.6, 1.5$ Hz, 2H, Ar-CH), 7.24 (d, $J = 6.9$ Hz, 2H, Ar-CH), 7.28 – 7.32 (m, 2H, Ar-CH) ppm | ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 126 MHz): $\delta = 31.2$ (CH_2), 118.4 (Ar-CH), 124.9 (Ar-CH), 127.9 (Ar-CH), 130.5 (Ar-CH), 132.3 (Ar- C_q), 137.5 (Ar- C_q) ppm | EI-HRMS m/z ber. für $[C_{14}H_{12}N_6]^+$ 264.1123, gef. 264.1124

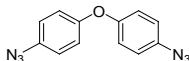
1,8-Diazidonaphthalen A11

0.12 g (0.56 mmol, 9 %) violetter Feststoff | $C_{10}H_6N_6$ | Säulenchromatografie (SiO_2): 0→4 % EtOAc in Cyclohexan | 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz): δ = 7.24 (d, J = 7.4 Hz, 2H, Ar-CH), 7.41 – 7.55 (m, 2H, Ar-CH), 7.82 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar-CH) ppm | ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 126 MHz): δ = 117.2 (Ar-CH), 119.0 (Ar- C_q), 125.5 (Ar-CH), 126.4 (Ar-CH), 135.6 (Ar- C_q), 136.7 (Ar- C_q) ppm | EI-HRMS m/z ber. für $[C_{10}H_6N_6]^+$ 210.0654, gef. 210.0654

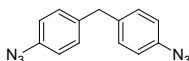
1,5-Diazidonaphthalen A12

331 mg (1.58 mmol, 25 %) gelber Feststoff | $C_{10}H_6N_6$ | Säulenchromatografie (SiO_2): 25 % EtOAc in Cyclohexan | 1H -NMR ($DMSO-d_6$, 500 MHz): δ = 7.52 (d, J = 7.4 Hz, 2H, Ar-CH), 7.62 (t, J = 7.9 Hz, 2H, Ar-CH), 7.87 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ar-CH) ppm | ^{13}C -NMR ($DMSO-d_6$, 126 MHz): δ = 115.7 (Ar-CH), 118.7 (Ar-CH), 126.4 (Ar- C_q), 126.6 (Ar-CH), 135.9 (Ar- C_q) ppm | EI-HRMS m/z ber. für $[C_{10}H_6N_6]^+$ 210.0654, gef. 210.0655

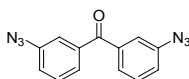
105

4,4'-Diazidodiphenylether A13

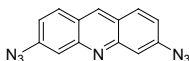
1.10 g (4.38 mmol, 84 %) brauner Feststoff | $C_{12}H_8N_6O$ | Säulenchromatografie (SiO_2): Cyclohexan | 1H -NMR ($DMSO-d_6$, 500 MHz): δ = 7.03 – 7.08 (m, 4H, Ar-CH), 7.11 – 7.16 (m, 4H, Ar-CH) ppm | ^{13}C -NMR ($DMSO-d_6$, 126 MHz): δ = 119.9 (Ar-CH), 120.5 (Ar-CH), 134.4 (Ar- C_q), 153.7 (Ar- C_q) ppm | EI-HRMS m/z ber. für $[C_{12}H_8N_6O]^+$ 252.0760, gef. 252.0760

4,4'-Bis(azidophenyl)methan A14

0.80 g (3.20 mmol, 64 %) dunkelbrauner Feststoff | $C_{13}H_{10}N_6$ | Säulenchromatografie (SiO_2): Cyclohexan | 1H -NMR ($DMSO-d_6$, 500 MHz): δ = 3.92 (s, 2H, CH_2), 6.96 – 7.11 (m, 4H, Ar-CH), 7.26 (m, 4H, Ar-CH) ppm | ^{13}C -NMR ($DMSO-d_6$, 126 MHz): δ = 119.0 (Ar-CH), 130.0 (Ar-CH), 137.0 (Ar- C_q), 138.0 (Ar- C_q) ppm | EI-HRMS m/z ber. für $[C_{13}H_{10}N_6]^+$ 250.0967, gef. 250.0967

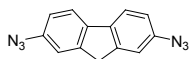
3,3'-Diazidobenzophenon A15

0.45 g (1.72 mmol, 73 %) farbloser Feststoff | $C_{13}H_8N_6O$ | Säulenchromatografie (SiO_2): Cyclohexan | $R_f = 0.43$, 10 % EtOAc in Cyclohexan | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): $\delta = 7.36 - 7.39$ (m, 2H, Ar-CH), 7.44 (ddd, $J = 8.0, 2.4, 1.0$ Hz, 2H, Ar-CH), 7.51, 7.59 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, Ar-CH) ppm | ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 126 MHz): $\delta = 119.5$ (Ar-CH), 123.3 (Ar-CH), 126.2 (Ar-CH), 130.2 (Ar-CH), 138.1 (Ar- C_q), 139.9 (Ar- C_q), 193.8 (O= C_q) ppm | EI-HRMS m/z ber. für $[C_{13}H_8N_6O]^+$ 264.0760, gef. 264.0750

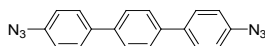
3,6-Diazidoacridin A16

0.48 g (1.84 mmol, 63 %) gelb-brauner Feststoff | $C_{13}H_7N_7$ | Säulenchromatografie (SiO_2): Cyclohexan | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): $\delta = 7.46$ (dd, $J = 9.0, 2.1$ Hz, 2H, Ar-CH), 7.67 (d, $J = 2.0$ Hz, 2H, Ar-CH), 8.29 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H, Ar-CH), 9.37 (s, 1H, Ar-CH) ppm | APT (DMSO- d_6 , 126 MHz): $\delta = 108.3$ (Ar-CH), 122.5 (Ar-CH), 124.8 (Ar- C_q), 133.6 (Ar-CH), 143.9 (Ar- C_q), 147.5 (Ar-CH), 151.2 (Ar- C_q) ppm | EI-HRMS m/z ber. für $[C_{13}H_7N_7]^+$ 261.0763, gef. 261.0762

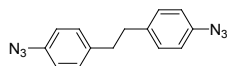
106

2,7-Diazidofluoren A17

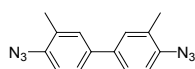
0.14 g (0.58 mmol, 76 %) hellgelber Feststoff | $C_{13}H_8N_6$ | Säulenchromatografie (SiO_2): Cyclohexan | $R_f = 0.67$, 20 % EtOAc in Cyclohexan | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): $\delta = 3.93$ (s, 2H, CH_2), 7.11 (dd, $J = 8.2, 2.2$ Hz, 2H, Ar-CH), 7.34 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H, Ar-CH), 7.89 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, Ar-CH) ppm | ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 126 MHz): $\delta = 36.3$ (CH_2), 115.8 (Ar-CH), 117.9 (Ar-CH), 121.1 (Ar-CH), 2×137.6 (Ar- C_q), 144.9 (Ar- C_q) ppm | EI-HRMS m/z ber. für $[C_{13}H_8N_6]^+$ 248.0811, gef. 248.0811

4,4'-Diazido-*p*-terphenyl A18

0.32 g (1.03 mmol, 54 %) bronzener Feststoff | $C_{18}H_{12}N_6$ | Säulenchromatografie (SiO_2): Produkt kristallisierte bei 2 % EtOAc in Cyclohexan aus, von SiO_2 reextrahiert mit 50 % CH_2Cl_2 in EtOAc | $R_f = 0.15$, Cyclohexan | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): $\delta = 7.24$ (d, $J = 8.6$ Hz, 4H, Ar-CH), 7.78 (s, 4H, Ar-CH), 7.80 (m, 4H, Ar-CH) ppm | EI-HRMS m/z ber. für $[C_{18}H_{12}N_6]^+$ 312.1123, gef. 312.1122

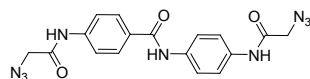
4,4'-Diazidodiphenylethan A19

0.75 g (2.84 mmol, 60 %) orange-brauner Feststoff | $C_{14}H_{12}N_6$ | Säulenchromatografie (SiO_2): Cyclohexan | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 2.85 (s, 4H, CH_2), 7.00 (d, J = 8.5 Hz, 4H, Ar-CH), 7.23 (d, J = 8.5 Hz, 4H, Ar-CH) ppm | ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 126 MHz): δ = 35.9 (CH_2), 118.6 (Ar-CH), 129.7 (Ar-CH), 136.6 (Ar- C_q), 138.1 (Ar- C_q) ppm | EI-HRMS m/z ber. für $[C_{14}H_{12}N_6]^+$ 264.1123, gef. 264.1123

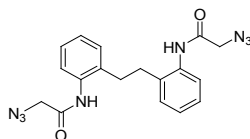
3,3'-Dimethylbiphenyl-4,4'-diazid A20

0.15 g (0.57 mmol, 81 %) brauner Feststoff | $C_{14}H_{12}N_6$ | Säulenchromatografie (SiO_2): Cyclohexan | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 2.22 (s, 6H, CH_3), 7.29 (d, J = 8.0 Hz, 2H, Ar-CH), 7.54 – 7.59 (m, 4H, Ar-CH) ppm | ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 126 MHz): δ = 16.7 (CH_3), 118.6 (Ar-CH), 125.1 (Ar-CH), 128.8 (Ar-CH), 129.0 (Ar- C_q), 135.5 (Ar- C_q), 136.7 (Ar- C_q) ppm | EI-HRMS m/z ber. für $[C_{14}H_{12}N_6]^+$ 264.1118, gef. 264.1123

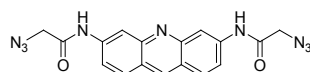
Allgemeine Synthesevorschrift für die Bisazide A21 bis A27 ^[104] Unter einer Argon-Schutzgasatmosphäre wurde das jeweilige Diamin (1 Äq., mmol-Maßstab) in wasserfreiem Toluol (0.7 M) gelöst und mit wasserfreiem NEt_3 (1.5 Äq.) versetzt. Nach Abkühlen der Lösung auf 0 °C, wurde vorsichtig Chloracetylchlorid (2.5 Äq.) hinzuge tropft. Das Reaktionsgemisch wurde langsam auf RT gebracht und für 48 h gerührt. Der ausfallende Niederschlag wurde durch Filtration abgetrennt, mit Toluol gewaschen und im Feinvakuum getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in DMF (0.15 M) aufgenommen und mit H_2O versetzt (0.08 M). Nach 10 min Stehenlassen bei RT wurde der Niederschlag durch Filtration separiert, mit H_2O gewaschen und im Feinvakuum getrocknet. Unter Annahme eines quantitativen Stoffumsatzes wurde der Feststoff in wasserfreiem DMF gelöst (0.5 M) und NaN_3 (3 Äq.) sowie eine Spatelspitze Dicyclohexano-18-Krone-6 zugegeben. Die Lösung wurde für 48 h bei 60 °C gerührt. Das Reaktionsvolumen wurde danach durch Zugabe von H_2O 20-fach erhöht. Das dadurch gebildete Präzipitat wurde durch Filtration abgetrennt, mit H_2O gewaschen und ohne weitere Reinigung für die CuAAC-Reaktionen eingesetzt.

4-Azidoacetyl-amino-*N*-(4'-(azidoacetyl-amino)phenyl)benzamid A21

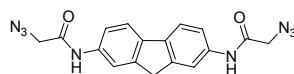
1.03 g (2.61 mmol, 59 %) brauner Feststoff | $C_{17}H_{15}N_9O_3$ | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 4.03 (s, 2H, N_3 -CH $_2$), 4.10 (s, 2H, CH $_2$), 7.56 (d, J = 9.0 Hz, 2H, Ar-CH), 7.72 (dd, J = 8.8, 5.3 Hz, 4H, Ar-CH), 7.95 (d, J = 8.8 Hz, 2H, Ar-CH), 10.13 (d, J = 6.5 Hz, 2H, NH), 10.42 (s, 1H, NH) ppm | ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 126 MHz): δ = 51.2 (N_3 -CH $_2$), 51.3 (N_3 -CH $_2$), 118.4 (Ar-CH), 119.5 (Ar-CH), 120.8 (Ar-CH), 128.6 (Ar-CH), 129.6 (Ar-C $_q$), 134.0 (Ar-C $_q$), 135.0 (Ar-C $_q$), 141.2 (Ar-C $_q$), 164.5 (O=C $_q$), 165.9 (O=C $_q$), 166.7 (O=C $_q$) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{17}H_{14}N_9O_3]^-$: 392.1225, gef. 392.1223

2,2'-Bis(azidoacetyl-amino)biphenyl A22

1.47 g (3.90 mmol, 83 %) cremefarbener Feststoff | $C_{18}H_{18}N_6O_2$ | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 2.79 (s, 4H, CH $_2$), 4.11 (s, 4H, N_3 -CH $_2$), 7.12 – 7.29 (m, 6H, Ar-CH), 7.40 (d, J = 7.2 Hz, 2H, Ar-CH), 9.59 (s, 2H, NH) ppm | ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 126 MHz): δ = 31.1 (CH $_2$), 51.0 (N_3 -CH $_2$), 2 \times 125.9 (Ar-CH), 126.3 (Ar-CH), 129.5 (Ar-CH), 135.0 (Ar-C $_q$), 135.7 (Ar-C $_q$), 166.8 (O=C $_q$) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{18}H_{19}N_6O_2]^+$ 379.1625, gef. 379.1633

3,6-Bis(azidoacetyl-amino)acridin A23

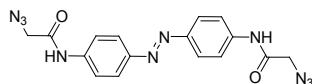
290 mg (0.77 mmol, 19 %) hellgelber Feststoff | $C_{17}H_{13}N_9O_2$ | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 4.17 (s, 4H, N_3 -CH $_2$), 7.65 (dd, J = 9.0, 1.9 Hz, 2H, Ar-CH), 8.10 (d, J = 9.1 Hz, 2H, Ar-CH), 8.49 (s, 2H, Ar-CH), 8.93 (s, 1H, Ar-CH), 10.62 (s, 2H, NH) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{17}H_{14}N_9O_2]^+$ 376.1270, gef. 376.1265

2,7-Bis(azidoacetyl-amino)fluoren A24

171 mg (0.50 mmol, 21 %) farbloser Feststoff | $C_{17}H_{14}N_8O_2$ | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ = 3.91 (s, 2H, CH $_2$), 4.06 (s, 4H, N_3 -CH $_2$), 7.53 (dd, J = 8.3, 1.8 Hz, 2H, Ar-CH), 7.76 (d, J = 8.2 Hz, 2H, Ar-CH), 7.89 (s, 2H, Ar-CH), 10.22 (s, 2H, NH) ppm | ^{13}C -NMR

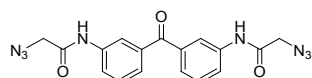
(DMSO-d₆, 126 MHz): δ = 36.6 (CH₂), 51.3 (N₃-CH₂), 116.1 (Ar-CH), 118.1 (Ar-CH), 119.7 (Ar-CH), 136.6 (Ar-C_q), 136.9 (Ar-C_q), 143.7 (Ar-C_q), 166.1 (O=C_q) ppm | EI-HRMS m/z ber. für [C₁₇H₁₄N₈O₂]⁺ 362.1240, gef. 362.1240

4,4'-Bis(azidoacetylaminophenyl)azobenzen A 25



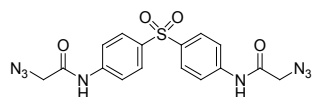
170 mg (0.45 mmol, 48 %) hellbrauner Feststoff | C₁₆H₁₄N₁₀O₂ | ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 3.94 (s, 4H, N₃-CH₂), 7.60 – 7.77 (m, 8H, Ar-CH), 10.35 (s, 2H, NH) ppm | ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 126 MHz): δ = 51.3 (N₃-CH₂), 119.6 (Ar-CH), 123.5 (Ar-CH), 141.0 (Ar-C_q), 147.9 (Ar-C_q), 166.8 (O=C_q) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für [C₁₆H₁₅N₁₀O₂]⁺ 379.1379, gef. 379.1375

3,3'-Bis(azidoacetylaminophenyl)benzophenon A26



0.34 g (0.89 mmol, 40 %) farbloser Feststoff | C₁₇H₁₄N₈O₃ | ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 4.07 (s, 4H, N₃-CH₂), 7.45 (d, J = 7.7 Hz, 2H, Ar-CH), 7.54 (t, J = 7.9 Hz, 2H, Ar-CH), 7.90 (d, J = 8.1 Hz, 2H, Ar-CH), 8.00 (s, 2H, Ar-CH), 10.42 (s, 2H, NH) ppm | ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 126 MHz): δ = 51.5 (N₃-CH₂), 120.3 (Ar-CH), 123.5 (Ar-CH), 125.1 (Ar-CH), 129.5 (Ar-CH), 137.7 (Ar-C_q), 138.8 (Ar-C_q), 166.9 (O=C_q), 195.5 (O=C_q) ppm | EI-HRMS m/z ber. für [C₁₇H₁₄N₈O₃]⁺ 378.1189, gef. 378.1189

4,4'-Bis(azidoacetylaminophenyl)methan A27



1.19 g (2.87 mmol, 66 %) cremefarbener Feststoff | C₁₆H₁₄N₈O₄S | ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 4.09 (s, 4H, N₃-CH₂), 7.76 – 7.85 (m, 4H, Ar-CH), 7.85 – 7.94 (m, 4H, Ar-CH), 10.58 (s, 2H, NH) ppm | ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 126 MHz): δ = 51.3 (N₃-CH₂), 119.4 (Ar-CH), 128.5 (Ar-CH), 135.6 (Ar-C_q), 142.8 (Ar-C_q), 167.1 (O=C_q) ppm | EI-HRMS m/z ber. für [C₁₆H₁₄N₈O₄S]⁺ 414.0859, gef. 414.0859

6-3.5 | Aufbau der Substanzbibliothek durch CuAAC

Allgemeine Vorschrift zum Aufbau der Substanzbibliothek mit CuAAC | In einem 4-ml-Schraubdeckelglas wurden nacheinander die tabellierten Mengen an Alkin, Azid sowie TBTA vorgelegt (Tab. 6-1). Durch diese Lösung wurde für 30 sek ein Argongasstrom (Eppendorf-Plastikspitze) geleitet. Anschließend wurden frisch hergestellte NaAsc- und $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ -Lösung zugefügt (s. Tab. 6-1) und das Schraubdeckelglas verschlossen. Nach 3 d Schütteln bei 50 °C und 250 rpm wurde der Reaktionsfortschritt per DC überprüft (2-DOS-Derivate: 50 - 70 % EtOAc in Cyclohexan, Neaminderivate: 5 % MeOH in CH_2Cl_2). Bei unvollständigem Umsatz des Azids wurde der Reaktionslösung eine weitere Portion Alkin (0.2 Äq.) zugesetzt. Durch die Lösung wurde anschließend für 30 sek ein Argongasstrom (Eppendorf-Plastikspitze) geleitet. Nach Zugabe von NaAsc- (1 Äq.) und $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ -Lösung (0.7 Äq.) wurde das Gemisch für weitere 2 d bei 50 °C und 250 rpm geschüttelt. War das Azid nach 3 d Schütteln vollständig umgesetzt, wurde das Rohprodukt ohne weitere Zwischenschritte säulenchromatografisch an Kieselgel ($\varnothing 2 \times 6$ cm) mit den tabellierten Gradienten gereinigt (Tab. 6-2). Die produktenthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und unter reduziertem Druck eingeeengt. Für die Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppen wurde der Rückstand für 15 min bei 0 °C mit 0.5 ml 4 M HCl-Lösung in 1,4-Dioxan behandelt und anschließend mit 0.5 ml wässrigem 1,4-Dioxan (1:1, v/v, 2-DOS-Derivate) bzw. H_2O (Neaminderivate) verdünnt. Das Reaktionsgemisch wurde für weitere 20 min gerührt und anschließend durch Koevaporation mit EtOH im Feinvakuum bis zur Trockne eingeeengt. Abschließend erfolgte eine Reinigung des Rohprodukts mithilfe von *CHROMABOND*®-RP₁₈-Säulen (mit 6 ml MeOH konditioniert, mit 3 \times 6 ml Millipore- H_2O äquilibriert). Dazu wurde das getrocknete Rohprodukt in 4 ml Millipore- H_2O gelöst, auf die *CHROMABOND*®-RP₁₈-Säule aufgetragen und ohne Druck eluiert. Zusätzlich wurden zwei weitere Fraktionen gesammelt (2 \times 3 ml Millipore- H_2O). Die produktenthaltenden Fraktionen wurden mittels DC identifiziert (2-DOS-Derivate: 15 % konz. NH_3 in MeOH, Neaminderivate: 30 % konz. NH_3 in MeOH), vereint, in der *Speedvac* bis zur Trockne eingeeengt, NMR-spektroskopisch untersucht und abschließend lyophilisiert.

Tab. 6-1 | Eingesetzte Äquivalente für die CuAAC

Substanz	n [mmol]	Äq.	c [mol/l]	V [μl]
Alkin (in DMF)	0.04	2	0.1	400
Azid (in DMF)	0.02	1	0.1	200
TBTA (in DMF)	0.02	1	0.5	40
NaAsc (in H_2O) *	0.02	1	2.0	10
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (in H_2O)	0.014	0.7	0.7	20

* NaAsc-Lösung ist nicht lagerbar und muss direkt vor Gebrauch hergestellt werden.

Tab. 6-2 | Gradienten-Protokoll für die Säulenchromatografie an Kieselgel

Verbindung	Gradient
2-DOS-Dimere mit A1-3, A6, A7, A21-30, A32-34, A37-41	20 % (25 ml) → 30 % (25 ml) → 40 % (50 ml) → 50 % (75 ml) → 60 % (75 ml) → 100 % (100 ml) EtOAc in Cyclohexan
2-DOS-Dimere mit A4, A5, A8-A20, A31, A35, A36, A42, A43	20 % (25 ml) → 30 % (25 ml) → 40 % (25 ml) → 50 % (75 ml) → 60 % (75 ml) → 100 % (25 ml) EtOAc in Cyclohexan
Neamin-Dimere mit A1-3, A6, A7, A21-30, A32-34, A37-41	0 % (25 ml) → 1 % (25 ml) → 2,5 % (100 ml) → 5 % (50 ml) → 10 % (50 ml) MeOH in CH ₂ Cl ₂
Neamin-Dimere mit A4, A5, A8-A20, A31, A35, A36, A42, A43	0 % (50 ml) → 1 % (100 ml) → 2,5 % (50 ml) → 5 % (100 ml) → 10 % (25 ml) MeOH in CH ₂ Cl ₂

Anmerkung zu den nachfolgenden analytischen Daten: Neben den isolierten Substanzmengen und Ausbeuten sind die Summenformeln, die ¹H- bzw. ¹³C-NMR-Daten, die berechneten sowie gefundenen m/z-Verhältnisse der ESI-HRMS-Analyse und auch die Retentionszeit der analytischen UPLC-Trennungen inklusive Reinheitsgrad angegeben. Alle ¹H- und ¹³C-Spektren wurden in D₂O bei 500 und 126 MHz aufgenommen, ¹H- sowie ¹³C-NMR-Signale wurden nicht zugeordnet, in einigen ¹³C-NMR-Spektren konnten die Triazol-Signale trotz Akkumulierung nicht beobachtet werden. Das entsprechende ¹H-NMR-Signal war aber immer vorhanden. Die alkinylierten RNA-Bindungsmotive in den Konjugaten sind mit **D** für 4-*O*-Propargyl-2-desoxystreptamin, mit **D*** für 4-*O*-Pentinyll-2-desoxystreptamin und mit **N** für 6'-*N*-Propargylneamin abgekürzt.

111

D | A1 | 7.9 mg (10.4 μmol, 52 %) | C₂₆H₄₈N₁₀O₇ | ¹H-NMR: δ = 1.51 – 1.61 (m, 4H), 1.85 (q, *J* = 12.5 Hz, 2H), 1.92 – 2.01 (m, 4H), 2.47 (dt, *J* = 12.5, 4.2 Hz, 2H), 3.27 – 3.36 (m, 2H), 3.37 – 3.44 (m, 2H), 3.49 (t, *J* = 6.4 Hz, 4H), 3.57 – 3.71 (m, 6H), 4.47 (t, *J* = 7.0 Hz, 4H), 4.91 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H), 5.11 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H), 8.08 (s, 2H) ppm | ¹³C-NMR: δ = 25.5, 26.2, 28.2, 49.1, 49.9, 50.2, 64.8, 69.6, 72.4, 75.3, 79.9, 125.2, 143.8 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für [C₂₆H₄₉N₁₀O₇]⁺ 613.3785, gef. 613.3794 | *t_R* = 3.56 min (90 %)

D | A2 | 7.8 mg (9.9 μmol, 50 %) | C₂₆H₄₈N₁₀O₉ | ¹H-NMR: δ = 1.85 (q, *J* = 12.5 Hz, 2H), 2.47 (dt, *J* = 12.4, 4.1 Hz, 2H), 3.29 – 3.36 (m, 2H), 3.36 – 3.43 (m, 2H), 3.55 – 3.68 (m, 14H), 3.95 – 3.99 (m, 4H), 4.60 – 4.67 (m, 4H), 4.90 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H), 5.10 (d, *J* = 12.0 Hz, 2H), 8.10 (s, 2H) ppm | ¹³C-NMR: δ = 28.2, 49.1, 49.9, 50.1, 64.8, 68.7, 69.4, 69.6, 72.5, 75.4, 79.9, 125.6, 138.1 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für [C₂₆H₄₉N₁₀O₉]⁺ 645.3684, gef. 645.3694 | *t_R* = 2.86 min (90 %)

D | A3 | 8.4 mg (11.3 μmol, 56 %) | C₂₄H₄₄N₁₀O₈ | ¹H-NMR: δ = 1.85 (q, *J* = 12.5 Hz, 2H), 2.47 (dt, *J* = 12.4, 4.0 Hz, 2H), 3.28 – 3.38 (m, 2H), 3.41 (t, *J* = 9.0 Hz, 2H), 3.56 – 3.67 (m, 10H), 3.92 (t, *J* = 5.0 Hz, 4H), 4.56 – 4.65 (m, 4H), 4.91 (d, *J* = 11.6 Hz, 2H), 5.10 (d, *J* = 11.6 Hz, 2H), 8.10 (s, 2H) ppm | ¹³C-NMR: δ = 28.2, 49.1, 50.0, 50.1, 64.8, 68.7, 69.5, 72.5, 75.4, 79.9, 125.5, 141.3 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für [C₂₄H₄₅N₁₀O₈]⁺ 601.3422, gef. 601.3440 | *t_R* = 2.05 min (83 %)

D | A4 | 10.5 mg (13.4 μmol , 67 %) | $\text{C}_{30}\text{H}_{42}\text{N}_{10}\text{O}_6$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.83 (q, J = 12.5 Hz, 2H), 2.38 – 2.50 (m, 2H), 3.25 – 3.32 (m, 2H), 3.33 – 3.40 (m, 2H), 3.52 – 3.67 (m, 6H), 4.87 (d, J = 12.1 Hz, 2H), 5.06 (d, J = 12.1 Hz, 2H), 5.73 (s, 4H), 7.40 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.76 (s, 2H), 7.87 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 8.09 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 28.1, 49.0, 49.9, 54.0, 64.7, 72.4, 75.3, 79.9, 125.4, 126.1, 127.3, 128.8, 132.4, 132.7, 133.0, 143.9 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{30}\text{H}_{43}\text{N}_{10}\text{O}_6]^+$ 639.3367, gef. 639.3401 | t_R = 4.44 min (99 %)

D | A5 | 10.7 mg (13.2 μmol , 66 %) | $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{N}_{10}\text{O}_6$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.81 (q, J = 12.5 Hz, 2H), 2.42 (dt, J = 12.5, 4.2 Hz, 2H), 3.25 – 3.31 (m, 2H), 3.31 – 3.40 (m, 2H), 3.52 – 3.64 (m, 6H), 4.86 (d, J = 4.7 Hz, 2H), 5.05 (s, 2H), 5.59 (s, 4H), 7.36 (s, 4H), 7.55 (s, 4H), 8.03 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 28.2, 49.1, 49.9, 53.6, 64.8, 72.4, 75.3, 79.9, 125.2, 127.5, 128.8, 134.3, 140.1, 144.0 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{N}_{10}\text{O}_6]^+$ 665.3524, gef. 665.3556 | t_R = 4.84 min (> 99 %)

D | A6 | 5.2 mg (6.7 μmol , 34 %) | $\text{C}_{26}\text{H}_{48}\text{N}_{10}\text{O}_8$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.85 (q, J = 12.5 Hz, 2H), 2.20 (p, J = 6.5 Hz, 4H), 2.47 (dt, J = 12.3, 4.0 Hz, 2H), 3.29 – 3.35 (m, 2H), 3.37 – 3.44 (m, 2H), 3.50 – 3.68 (m, 14H), 4.54 (t, J = 6.8 Hz, 4H), 4.91 (d, J = 11.9 Hz, 2H), 5.11 (d, J = 11.9 Hz, 2H), 8.08 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 28.2, 29.2, 47.5, 49.1, 49.9, 64.9, 67.3, 69.4, 72.5, 75.4, 80.0, 125.2, 143.8 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{26}\text{H}_{49}\text{N}_{10}\text{O}_8]^+$ 629.3735, gef. 629.3749 | t_R = 3.29 min (78 %)

112 **D | A7** | 9.2 mg (11.4 μmol , 57 %), als ~ 1:3 Gemisch von Diastereomeren | $\text{C}_{31}\text{H}_{54}\text{N}_{10}\text{O}_6$ | $^1\text{H-NMR}$ für 1 Diastereomer: δ = 1.01 – 1.12 (m, 4H), 1.30 – 1.38 (m, 1H), 1.37 – 1.51 (m, 2H), 1.57 – 1.65 (m, 1H), 1.66 – 1.81 (m, 6H), 1.82 – 1.91 (m, 4H), 2.06 – 2.13 (m, 4H), 2.37 (dt, J = 12.5, 4.3 Hz, 2H), 3.18 – 3.25 (m, 2H), 3.27 – 3.33 (m, 2H), 3.45 – 3.56 (m, 6H), 4.43 (tdd, J = 12.6, 5.9, 3.0 Hz, 2H), 4.81 (d, J = 12.1 Hz, 2H), 5.01 (d, J = 12.1 Hz, 2H), 7.99 (d, J = 2.4 Hz, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 27.6, 2 \times 28.1, 31.3, 32.6, 32.9, 49.1, 49.8, 60.9, 64.8, 72.4, 75.3, 79.8, 123.2, 143.2 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{31}\text{H}_{55}\text{N}_{10}\text{O}_6]^+$ 663.4301, gef. 663.4306 | t_R = 5.52 min (26 %) t_R = 5.73 min (52 %)

D | A8 | 3.6 mg (4.5 μmol , 22 %) | $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_{12}\text{O}_6$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.80 (q, J = 12.5 Hz, 2H), 2.41 (dt, J = 12.4, 4.2 Hz, 2H), 3.23 – 3.31 (m, 2H), 3.33 – 3.41 (m, 2H), 3.49 – 3.68 (m, 6H), 4.88 – 4.96 (m, 2H), 5.05 – 5.12 (m, 2H), 7.79 (br, 4H), 7.88 (br, 4H), 8.48 (d, J = 2.6 Hz, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 28.2, 49.1, 49.9, 64.7, 72.5, 75.4, 79.9, 121.3, 123.2, 124.3, 138.0, 144.6, 151.6 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_{12}\text{O}_6]^+$ 665.3272, gef. 665.3303 | t_R = 5.64 min (91 %)

D | A9 | 8.4 mg (10.2 μmol , 51 %) | $\text{C}_{31}\text{H}_{41}\text{N}_{11}\text{O}_7$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.87 (q, J = 12.3 Hz, 2H), 2.49 (dt, J = 12.5, 4.2 Hz, 2H), 3.30 – 3.39 (m, 2H), 3.42 – 3.49 (m, 2H), 3.59 – 3.73 (m, 9H), 4.99 (dd, J = 12.2, 7.8 Hz, 2H), 5.17 (dd, J = 12.2, 7.9 Hz, 2H), 7.76 (s, 4H), 7.90 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 8.05 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 8.48 (s, 1H), 8.58 (s, 1H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 2 \times 28.2, 2 \times 49.1, 2 \times 49.9, 2 \times 64.8, 2 \times 72.5, 2 \times 75.4, 79.9, 79.9, 2 \times 120.8, 2 \times 121.7, 2 \times 123.0,

2 × 123.5, 2 × 129.4, 133.2, 134.3, 138.1, 138.9, 144.4, 144.6, 167.9 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{31}H_{42}N_{11}O_7]^+$ 680.3268, gef. 680.3265 | $t_R = 4.72$ min (> 99 %)

D | A10 | 12.6 mg (15.6 μmol, 78 %) | $C_{32}H_{44}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: $\delta = 1.88$ (q, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.48 (dt, $J = 12.5, 4.2$ Hz, 2H), 2.73 (s, 4H), 3.28 – 3.40 (m, 2H), 3.40 – 3.49 (m, 2H), 3.57 – 3.71 (m, 6H), 4.91 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 5.12 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 7.10 – 7.20 (m, 2H), 7.21 – 7.30 (m, 2H), 7.38 – 7.49 (m, 4H), 7.59 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.2, 31.6, 49.1, 49.9, 64.7, 72.5, 75.4, 80.0, 126.2, 126.4, 127.5, 131.0, 131.1, 134.9, 136.4, 143.5$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{32}H_{45}N_{10}O_6]^+$ 665.3524, gef. 665.3554 | $t_R = 4.99$ min (> 99 %)

D | A11 | 5.2 mg (6.9 μmol, 35 %) | $C_{28}H_{38}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: $\delta = 1.86$ (q, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.47 (dt, $J = 12.5, 4.2$ Hz, 2H), 3.30 – 3.37 (m, 2H), 3.40 – 3.48 (m, 2H), 3.57 – 3.69 (m, 6H), 4.85 (d, $J = 19.6$ Hz, 2H), 5.04 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 7.74 (dd, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 2H), 7.80 – 7.88 (m, 2H), 7.98 (s, 2H), 8.43 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.2, 49.0, 49.9, 64.5, 72.3, 72.5, 75.5, 126.5, 127.6, 129.4, 129.6, 2 \times 132.7, 135.5, 143.4$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{28}H_{39}N_{10}O_6]^+$ 611.3054, gef. 611.3075 | $t_R = 3.96$ min (98 %)

D | A12 | 9.2 mg (12.2 μmol, 61 %) | $C_{28}H_{38}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: $\delta = 1.88$ (q, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.48 (dt, $J = 12.4, 4.2$ Hz, 2H), 3.33 (ddd, $J = 12.5, 10.2, 4.2$ Hz, 2H), 3.46 (ddd, $J = 12.6, 10.4, 4.2$ Hz, 2H), 3.57 – 3.67 (m, 6H), 3.70 – 3.78 (m, 2H), 5.08 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 5.27 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 7.74 (s, 4H), 7.82 (s, 2H), 8.49 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.2, 49.2, 49.9, 64.9, 72.5, 75.4, 80.2, 124.9, 125.5, 2 \times 127.4, 127.8, 129.0, 133.0, 144.1$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{28}H_{39}N_{10}O_6]^+$ 611.3054, gef. 611.3083 | $t_R = 3.48$ min (99 %)

D | A13 | 14.1 mg (17.7 μmol, 89 %) | $C_{30}H_{40}N_{10}O_7$ | 1H -NMR: $\delta = 1.80 - 1.90$ (m, 2H), 2.40 – 2.51 (m, 2H), 3.27 – 3.35 (m, 2H), 3.37 – 3.45 (m, 2H), 3.55 – 3.71 (m, 6H), 4.93 – 5.01 (m, 2H), 5.11 – 5.19 (m, 2H), 7.13 – 7.34 (m, 4H), 7.62 – 7.83 (m, 4H), 8.43 (d, $J = 16.0$ Hz, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.2, 49.1, 49.9, 64.8, 72.4, 75.4, 79.8, 120.1, 123.1, 123.7, 132.2, 144.3, 157.0$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{30}H_{41}N_{10}O_7]^+$ 653.3160, gef. 653.3181 | $t_R = 5.31$ min (> 99 %)

D | A14 | 12.4 mg (15.6 μmol, 78 %) | $C_{31}H_{42}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: $\delta = 1.78 - 1.88$ (m, 2H), 2.44 (dt, $J = 12.4, 4.1$ Hz, 2H), 3.26 – 3.33 (m, 2H), 3.36 – 3.43 (m, 2H), 3.50 – 3.68 (m, 6H), 3.98 (br, 2H), 4.94 (m, 2H), 5.12 (m, 2H), 7.35 (br, 4H), 7.55 (br, 4H), 8.36 (br, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.2, 40.1, 49.1, 49.9, 64.7, 72.4, 75.4, 79.8, 121.1, 123.5, 130.2, 134.5, 142.6, 144.3$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{31}H_{43}N_{10}O_6]^+$ 651.3367, gef. 651.3402 | $t_R = 5.38$ min (> 99 %)

D | A15 | 10.6 mg (13.1 μmol, 66 %) | $C_{31}H_{40}N_{10}O_7$ | 1H -NMR: $\delta = 1.84$ (q, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.40 – 2.51 (m, 2H), 3.26 – 3.35 (m, 2H), 3.37 – 3.46 (m, 2H), 3.54 – 3.70 (m, 6H), 4.96 (d, $J = 11.2$ Hz, 2H), 5.14 (d, $J = 10.9$ Hz, 2H), 7.65 – 7.76 (m, 2H), 7.79 – 7.92 (m, 2H), 7.95 – 8.16 (m, 4H), 8.51 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.2, 49.1, 49.9, 64.7, 72.4, 75.4, 79.9,$

122.0, 123.6, 125.6, 130.4, 131.2, 136.5, 137.7, 144.6 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{31}H_{41}N_{10}O_7]^+$ 665.3160, gef. 665.3196 | $t_R = 5.21$ min (85 %)

D | A16 | 6.8 mg (8.5 μ mol, 42 %) | $C_{31}H_{39}N_{11}O_6$ | 1H -NMR: $\delta = 1.93$ (q, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.54 (dt, $J = 12.2, 4.2$ Hz, 2H), 3.37 – 3.43 (m, 2H), 3.50 – 3.55 (m, 2H), 3.64 – 3.82 (m, 6H), 5.06 (d, $J = 12.4$ Hz, 2H), 5.25 (d, $J = 12.2$ Hz, 2H), 8.04 – 8.31 (m, 6H), 8.80 (s, 2H), 9.31 (s, 1H) ppm | ^{13}C -NMR ohne Ar- C_q : $\delta = 28.2, 49.1, 49.9, 64.7, 72.5, 75.4, 80.1, 111.6, 123.1, 125.2, 129.8, 132.3, 137.8, 143.6, 145.1, 146.9$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{31}H_{40}N_{11}O_6]^+$ 662.3163, gef. 662.3191 | $t_R = 5.42$ min (87 %)

D | A17 | 11.6 mg (14.6 μ mol, 73 %) | $C_{31}H_{40}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: $\delta = 1.85$ (q, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.45 (dt, $J = 12.3, 4.2$ Hz, 2H), 3.28 – 3.34 (m, 2H), 3.39 – 3.45 (m, 2H), 3.54 (s, 2H), 3.56 – 3.66 (m, 6H), 4.81 (d, $J = 12.2$ Hz, 2H), 4.99 (d, $J = 12.2$ Hz, 2H), 7.35 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.42 (s, 2H), 7.58 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 8.26 (s, 2H) ppm | APT-NMR: $\delta = 28.2, 36.6, 49.2, 50.0, 64.8, 72.5, 75.5, 80.0, 116.1, 118.7, 121.1, 122.5, 134.4, 140.4, 144.2, 144.9$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{31}H_{41}N_{10}O_6]^+$ 649.3210, gef. 649.3246 | $t_R = 5.24$ min (95 %)

D | A18 | 3.9 mg (4.6 μ mol, 23 %) | $C_{36}H_{44}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: $\delta = 1.82 - 1.95$ (m, 2H), 2.43 – 2.52 (m, 2H), 3.31 – 3.40 (m, 2H), 3.41 – 3.50 (m, 2H), 3.58 – 3.75 (m, 6H), 4.86 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H), 5.01 (d, $J = 9.7$ Hz, 2H), 7.07 – 7.59 (m, 12H), 8.36 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.2, 49.1, 50.0, 64.7, 72.5, 75.5, 79.9, 120.2, 122.7, 126.8, 127.5, 134.9, 137.5, 139.8, 144.3$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{36}H_{45}N_{10}O_6]^+$ 713.3524, gef. 713.3567 | $t_R = 6.46$ min (> 99 %)

D | A19 | 9.7 mg (12.0 μ mol, 60 %) | $C_{32}H_{44}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: $\delta = 1.83$ (q, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.45 (dt, $J = 12.4, 4.2$ Hz, 2H), 2.93 – 3.04 (m, 4H), 3.26 – 3.34 (m, 2H), 3.35 – 3.43 (m, 2H), 3.53 – 3.69 (m, 6H), 4.95 (dd, $J = 12.1, 2.3$ Hz, 2H), 5.13 (dd, $J = 12.1, 2.4$ Hz, 2H), 7.28 – 7.38 (m, 4H), 7.51 – 7.61 (m, 4H), 8.38 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.2, 36.1, 49.1, 49.9, 64.8, 72.4, 75.4, 79.8, 121.0, 123.6, 130.0, 134.3, 143.3, 144.2$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{32}H_{45}N_{10}O_6]^+$ 665.3524, gef. 665.3545 | $t_R = 5.74$ min (> 99 %)

D | A20 | 11.3 mg (14.0 μ mol, 70 %) | $C_{32}H_{44}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: $\delta = 1.90$ (q, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.23 (s, 6H), 2.51 (dt, $J = 12.4, 4.3$ Hz, 2H), 3.35 (ddd, $J = 12.5, 10.0, 4.3$ Hz, 2H), 3.43 – 3.50 (m, 2H), 3.60 – 3.70 (m, 6H), 3.71 – 3.77 (m, 2H), 5.04 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 5.24 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 7.52 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.70 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H), 7.77 (s, 2H), 8.32 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 16.8, 28.2, 49.1, 49.9, 62.5, 64.8, 72.4, 75.3, 80.1, 125.5, 126.5, 126.7, 130.0, 134.4, 135.2, 141.2, 143.8$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{32}H_{45}N_{10}O_6]^+$ 665.3524, gef. 665.3545 | $t_R = 4.97$ min (99 %)

D | A21 | 3.3 mg (3.5 μ mol, 18 %) | $C_{35}H_{47}N_{13}O_9$ | 1H -NMR: $\delta = 1.85$ (s, 2H), 2.46 (s, 2H), 3.33 (s, 2H), 3.42 (s, 2H), 3.54 – 3.75 (m, 13H), 4.98 (d, $J = 11.6$ Hz, 2H), 5.14 – 5.21 (m, 2H), 5.51 (d, $J = 14.1$ Hz, 4H), 7.55 (s, 4H), 7.68 (s, 2H), 7.91 (d, $J = 6.1$ Hz, 2H), 8.17 (s,

2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 2 \times 28.1, 2 \times 49.0, 2 \times 49.8, 52.4, 52.5, 2 \times 64.7, 2 \times 72.4, 2 \times 75.3, 79.7, 79.8, 2 \times 120.8, 2 \times 122.3, 2 \times 123.3, 2 \times 126.7, 2 \times 128.6, 133.4, 133.7, 137.3, 137.4, 143.9, 144.1, 166.3, 166.4, 168.8$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{N}_{13}\text{O}_9]^+$ 794.3698, gef. 794.3734 | $t_R = 3.90$ min (> 99 %)

D | A22 | 12.3 mg (13.3 μmol , 67 %) | $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{N}_{12}\text{O}_8$ | ^1H -NMR: $\delta = 1.85$ (q, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.46 (dt, $J = 12.5, 4.2$ Hz, 2H), 2.85 (s, 4H), 3.29 – 3.35 (m, 2H), 3.36 – 3.43 (m, 2H), 3.55 – 3.68 (m, 6H), 4.94 (d, $J = 12.2$ Hz, 2H), 5.13 (d, $J = 12.2$ Hz, 2H), 5.41 (s, 4H), 7.22 – 7.35 (m, 8H), 8.13 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.2, 31.5, 49.1, 49.9, 52.2, 64.7, 72.4, 75.4, 79.9, 126.6, 127.0, 127.3, 128.1, 130.5, 133.2, 137.3, 144.1, 167.2$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{N}_{12}\text{O}_8]^+$ 779.3953, gef. 779.3989 | $t_R = 4.77$ min (96 %)

D | A23 | 11.3 mg (12.3 μmol , 62 %) | $\text{C}_{35}\text{H}_{45}\text{N}_{13}\text{O}_8$ | ^1H -NMR: $\delta = 1.88$ (q, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.45 – 2.53 (m, 2H), 3.31 – 3.39 (m, 2H), 3.40 – 3.50 (m, 2H), 3.59 – 3.74 (m, 6H), 4.97 (d, $J = 11.5$ Hz, 2H), 5.17 (d, $J = 11.7$ Hz, 2H), 5.59 (s, 4H), 7.47 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 8.04 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 8.11 (s, 2H), 8.22 (s, 2H), 9.12 (s, 1H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.1, 49.1, 49.9, 52.8, 64.8, 72.4, 75.3, 80.0, 104.5, 121.1, 121.8, 127.1, 131.4, 135.3, 140.2, 141.7, 144.7, 146.3, 167.2$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{N}_{13}\text{O}_8]^+$ 776.3593, gef. 776.3616 | $t_R = 4.92$ min (98 %)

D | A24 | 6.5 mg (7.2 μmol , 36 %) | $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{N}_{12}\text{O}_8$ | ^1H -NMR: $\delta = 1.84$ (q, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.46 (dt, $J = 12.5, 4.3$ Hz, 2H), 3.28 – 3.35 (m, 2H), 3.37 – 3.45 (m, 2H), 3.56 – 3.69 (m, 6H), 3.75 (s, 2H), 4.96 (d, $J = 12.2$ Hz, 2H), 5.14 (d, $J = 12.2$ Hz, 2H), 5.43 (s, 4H), 7.36 (dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, 2H), 7.59 (s, 2H), 7.68 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 8.14 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.1, 36.5, 49.0, 49.9, 52.4, 64.7, 72.4, 75.4, 79.8, 117.9, 120.0, 120.1, 126.6, 134.9, 138.0, 143.9, 144.5, 165.9$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{N}_{12}\text{O}_8]^+$ 763.3640, gef. 763.3668 | $t_R = 4.47$ min (98 %)

D | A25 | 6.7 mg (7.3 μmol , 36 %) | $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{N}_{14}\text{O}_8$ | ^1H -NMR: $\delta = 1.85$ (q, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.47 (dt, $J = 12.4, 4.2$ Hz, 2H), 3.29 – 3.36 (m, 2H), 3.38 – 3.45 (m, 2H), 3.57 – 3.69 (m, 6H), 4.96 (d, $J = 12.2$ Hz, 2H), 5.15 (d, $J = 12.2$ Hz, 2H), 5.47 (s, 4H), 7.62 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H), 7.74 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H), 8.14 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.1, 49.1, 49.9, 52.5, 62.5, 64.7, 72.4, 75.4, 79.8, 121.2, 123.6, 126.7, 139.4, 143.9, 148.8, 166.2$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{34}\text{H}_{47}\text{N}_{14}\text{O}_8]^+$ 779.3701, gef. 779.3708 | $t_R = 4.91$ min (> 99 %)

D | A26 | 9.8 mg (10.6 μmol , 53 %) | $\text{C}_{35}\text{H}_{46}\text{N}_{12}\text{O}_9$ | ^1H -NMR: $\delta = 1.86$ (q, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.47 (dt, $J = 12.5, 4.2$ Hz, 2H), 3.30 – 3.37 (m, 2H), 3.40 – 3.48 (m, 2H), 3.57 – 3.69 (m, 6H), 4.85 (d, $J = 19.6$ Hz, 1H), 5.04 (d, $J = 12.0$ Hz, 2H), 7.74 (dd, $J = 7.4, 1.1$ Hz, 1H), 7.81 – 7.87 (m, 2H), 7.98 (s, 2H), 8.43 (dd, $J = 8.4, 1.0$ Hz, 1H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.1, 49.0, 49.9, 52.4, 64.7, 72.4, 75.4, 79.8, 122.3, 125.7, 126.7, 127.3, 129.3, 136.6, 137.1, 143.9, 166.2, 198.7$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{35}\text{H}_{47}\text{N}_{12}\text{O}_9]^+$ 779.3589, gef. 779.3589 | $t_R = 4.70$ min (87 %)

D | A27 | 7.9 mg (8.2 μ mol, 41 %) | $C_{34}H_{46}N_{12}O_{10}S$ | 1H -NMR: δ = 1.79 (q, J = 12.5 Hz, 2H), 2.34 – 2.49 (m, 2H), 3.20 – 3.30 (m, 2H), 3.30 – 3.40 (m, 2H), 3.50 – 3.64 (m, 6H), 4.91 (d, J = 12.1 Hz, 2H), 5.10 (d, J = 12.1 Hz, 2H), 5.44 (s, 4H), 7.60 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 7.75 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 8.09 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 28.2, 49.1, 49.9, 52.6, 64.7, 72.4, 75.4, 79.9, 120.8, 126.7, 128.6, 135.1, 141.9, 144.0, 166.4 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{34}H_{47}N_{12}O_{10}S]^+$ 815.3259, gef. 815.3320 | t_R = 3.98 min (> 99 %)

D | A28 | 8.9 mg (11.4 μ mol, 57 %) | $C_{29}H_{54}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: δ = 1.06 – 1.21 (m, 14H), 1.68 – 1.81 (m, 6H), 2.34 (dt, J = 12.5, 4.2 Hz, 2H), 3.15 – 3.23 (m, 2H), 3.25 – 3.30 (m, 2H), 3.43 – 3.52 (m, 6H), 4.31 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 4.78 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 4.99 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 7.93 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 25.4, 27.9, 28.1, 28.4, 28.4, 29.3, 49.1, 49.9, 50.5, 64.8, 72.4, 75.3, 79.9, 125.0, 143.6 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{29}H_{55}N_{10}O_6]^+$ 639.4306, gef. 639.4353 | t_R = 6.02 min (89 %)

D | A29 | 6.2 mg (8.1 μ mol, 40 %) | $C_{28}H_{52}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: δ = 1.17 – 1.31 (m, 12H), 1.75 – 1.90 (m, 6H), 2.43 (dt, J = 12.5, 4.3 Hz, 2H), 3.25 – 3.32 (m, 2H), 3.33 – 3.40 (m, 2H), 3.51 – 3.64 (m, 6H), 4.40 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 4.87 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 5.08 (d, J = 12.0 Hz, 2H), 8.01 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 25.4, 27.9, 28.2, 28.3, 29.3, 49.1, 49.9, 50.5, 64.8, 72.4, 75.3, 79.9, 125.0, 143.5 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{32}H_{59}N_{12}O_8]^+$ 625.4150, gef. 625.4190 | t_R = 5.47 min (91 %)

116 **D | A30** | 12.8 mg (14.5 μ mol, 73 %) | $C_{32}H_{58}N_{12}O_8$ | 1H -NMR: δ = 1.20 – 1.35 (m, 12H), 1.42 – 1.56 (m, 4H), 1.80 (q, J = 12.5 Hz, 2H), 2.43 (dt, J = 12.4, 4.1 Hz, 2H), 3.21 (t, J = 6.9 Hz, 4H), 3.25 – 3.32 (m, 2H), 3.33 – 3.40 (m, 2H), 3.53 – 3.66 (m, 6H), 4.92 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 5.10 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 5.22 (s, 4H), 8.06 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 25.9, 28.1, 28.1, 28.2, 28.5, 39.7, 49.1, 49.9, 52.2, 64.7, 72.4, 75.4, 79.7, 126.5, 143.9, 167.5 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{32}H_{59}N_{12}O_8]^+$ 739.4579, gef. 739.4626 | t_R = 5.65 min (77 %)

D | A31 | 10.9 mg (14.9 μ mol, 74 %) | $C_{26}H_{40}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: δ = 1.83 (q, J = 12.5 Hz, 2H), 2.44 (dt, J = 12.5, 4.3 Hz, 2H), 3.30 (ddd, J = 12.5, 10.0, 4.2 Hz, 2H), 3.34 – 3.41 (m, 2H), 3.53 – 3.65 (m, 6H), 4.88 (d, J = 12.1 Hz, 2H), 5.08 (d, J = 12.1 Hz, 2H), 5.62 (s, 4H), 7.25 (s, 1H), 7.30 – 7.35 (m, 2H), 7.41 – 7.47 (m, 1H), 8.06 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 28.1, 49.1, 49.9, 53.6, 64.8, 72.4, 75.3, 79.9, 125.3, 127.5, 128.2, 129.8, 135.7, 144.0 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{26}H_{41}N_{10}O_6]^+$ 589.3210, gef. 589.3235 | t_R = 3.19 min (90 %)

D | A32 | 4.9 mg (5.6 μ mol, 28 %) | $C_{32}H_{44}N_{12}O_8$ | 1H -NMR: δ = 1.83 (q, J = 12.5 Hz, 2H), 2.41 – 2.49 (m, 2H), 3.26 – 3.35 (m, 2H), 3.35 – 3.44 (m, 2H), 3.52 – 3.71 (m, 6H), 4.98 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 5.16 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 5.74 (s, 4H), 7.49 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 7.57 – 7.65 (m, 2H), 8.04 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 8.23 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 28.1, 49.0, 49.8, 52.3, 64.7, 72.4, 75.3, 79.8, 125.3, 126.1, 127.0, 127.2, 129.3, 129.6, 135.6, 143.9, 167.9 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{32}H_{45}N_{12}O_8]^+$ 725.3483, gef. 725.3517 | t_R = 3.71 min (72 %)

D | A33 | 11.3 mg (13.0 μmol , 65 %) | $\text{C}_{32}\text{H}_{44}\text{N}_{12}\text{O}_8$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.83 (q, J = 12.5 Hz, 2H), 2.45 (dt, J = 12.4, 4.2 Hz, 2H), 3.27 – 3.35 (m, 2H), 3.35 – 3.43 (m, 2H), 3.53 – 3.70 (m, 6H), 4.97 (d, J = 12.3 Hz, 2H), 5.15 (d, J = 12.3 Hz, 2H), 5.69 (s, 4H), 7.57 – 7.68 (m, 4H), 7.99 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.22 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 28.2, 49.1, 49.9, 52.3, 64.7, 72.4, 75.4, 79.8, 122.3, 124.9, 126.6, 126.8, 129.7, 131.5, 144.1, 168.1 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{32}\text{H}_{45}\text{N}_{12}\text{O}_8]^+$ 725.3483, gef. 725.3496 | t_R = 2.77 min (56 %)

D | A34 | 9.4 mg (10.2 μmol , 51 %) | $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{N}_{12}\text{O}_8$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.84 (q, J = 12.5 Hz, 2H), 2.28 (s, 6H), 2.46 (dt, J = 12.4, 4.2 Hz, 2H), 3.29 – 3.38 (m, 2H), 3.38 – 3.46 (m, 2H), 3.53 – 3.72 (m, 6H), 4.97 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 5.15 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 5.55 (s, 4H), 7.32 – 7.43 (m, 2H), 7.51 (s, 2H), 7.59 (s, 2H), 8.19 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 17.0, 28.1, 49.0, 49.9, 52.1, 64.7, 72.4, 75.4, 79.8, 124.9, 126.6, 126.7, 129.1, 133.1, 134.6, 138.8, 144.0, 167.1 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{N}_{12}\text{O}_8]^+$ 779.3953, gef. 779.3980 | t_R = 4.20 min (91 %)

D | A35 | 11.2 mg (13.3 μmol , 66 %) | $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_{10}\text{O}_8\text{S}$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.86 (q, J = 12.5 Hz, 2H), 2.47 (dt, J = 12.5, 4.2 Hz, 2H), 3.29 – 3.35 (m, 2H), 3.39 – 3.46 (m, 2H), 3.55 – 3.71 (m, 6H), 5.00 (d, J = 12.3 Hz, 2H), 5.18 (d, J = 12.3 Hz, 2H), 8.00 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 8.16 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 8.60 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 28.1, 49.1, 49.9, 64.7, 72.4, 75.4, 79.9, 121.7, 123.5, 129.6, 139.6, 140.3, 144.8 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_{10}\text{O}_8\text{S}]^+$ 701.2830, gef. 701.2806 | t_R = 4.62 min (> 99 %)

117

D | A36 | 9.7 mg (11.5 μmol , 58 %) | $\text{C}_{30}\text{H}_{40}\text{N}_{10}\text{O}_8\text{S}$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.84 (q, J = 12.5 Hz, 2H), 2.45 (dt, J = 12.5, 4.2 Hz, 2H), 3.29 – 3.35 (m, 2H), 3.37 – 3.44 (m, 2H), 3.55 – 3.70 (m, 6H), 4.99 (d, J = 10.2 Hz, 2H), 5.16 (d, J = 10.3 Hz, 2H), 7.81 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 8.09 (d, J = 25.9 Hz, 4H), 8.42 (s, 2H), 8.57 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 28.2, 49.1, 49.9, 64.7, 72.5, 75.4, 79.9, 120.1, 123.8, 126.7, 128.5, 131.8, 137.2, 141.0, 144.7 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{30}\text{H}_{41}\text{N}_{10}\text{O}_8\text{S}]^+$ 701.2830, gef. 701.2865 | t_R = 4.64 min (96 %)

D | A37 | 7.3 mg (7.9 μmol , 40 %) | $\text{C}_{36}\text{H}_{50}\text{N}_{12}\text{O}_8$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.84 (q, J = 12.6 Hz, 2H), 2.46 (dt, J = 12.5, 4.2 Hz, 2H), 2.86 – 2.95 (m, 4H), 3.29 – 3.35 (m, 2H), 3.36 – 3.44 (m, 2H), 3.52 – 3.72 (m, 6H), 4.95 – 5.00 (m, 2H), 5.15 (dd, J = 12.2, 5.4 Hz, 2H), 5.40 – 5.50 (m, 4H), 7.18 – 7.28 (m, 4H), 7.34 (d, J = 8.0 Hz, 4H), 8.14 (d, J = 7.4 Hz, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 28.2, 36.2, 49.1, 50.0, 52.5, 64.7, 72.5, 75.4, 79.8, 121.5, 121.6, 126.7, 129.4, 134.1, 139.6, 144.0, 166.1 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{36}\text{H}_{51}\text{N}_{12}\text{O}_8]^+$ 779.3953, gef. 779.3993 | t_R = 5.34 min (98 %)

D | A38 | 11.9 mg (13.1 μmol , 66 %) | $\text{C}_{35}\text{H}_{48}\text{N}_{12}\text{O}_8$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.80 (q, J = 12.5 Hz, 1H), 2.42 (dt, J = 12.4, 4.2 Hz, 2H), 3.26 – 3.34 (m, 2H), 3.34 – 3.41 (m, 2H), 3.53 – 3.64 (m, 6H), 3.89 (s, 2H), 4.92 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 5.10 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 5.35 – 5.44 (m, 4H), 7.19 – 7.29 (m, 4H), 7.31 – 7.39 (m, 4H), 8.06 – 8.12 (m, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 28.1, 40.0, 49.0, 49.9, 52.4, 64.7, 72.4, 75.4, 79.7, 121.9, 126.7, 129.4, 134.4, 139.2, 143.9,

166.2 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{35}H_{49}N_{12}O_8]^+$ 765.3796, gef. 765.3826 | t_R = 4.99 min (89 %)

D | A39 | 8.0 mg (8.8 μ mol, 44 %) | $C_{34}H_{46}N_{12}O_9$ | 1H -NMR: δ = 1.83 (q, J = 12.5 Hz, 2H), 2.45 (dt, J = 12.5, 4.2 Hz, 2H), 3.27 – 3.35 (m, 2H), 3.35 – 3.44 (m, 2H), 3.50 – 3.69 (m, 6H), 4.96 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 5.14 (d, J = 12.2 Hz, 2H), 5.47 (s, 4H), 7.06 – 7.13 (m, 4H), 7.43 – 7.50 (m, 4H), 8.15 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 28.1, 49.1, 49.9, 52.4, 64.7, 72.4, 75.4, 79.8, 119.4, 123.8, 126.7, 131.8, 144.1, 154.4, 166.4 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{34}H_{47}N_{12}O_9]^+$ 767.3589, gef. 767.3618 | t_R = 4.53 min (88 %)

D | A40 | 9.6 mg (8.2 μ mol, 41 %) | $C_{46}H_{54}N_{10}O_{14}S_2$ | 1H -NMR: δ = 1.79 – 1.96 (m, 2H), 2.40 – 2.55 (m, 2H), 3.28 – 3.48 (m, 10H), 3.53 – 3.74 (m, 6H), 4.85 – 4.93 (br, 2H), 5.07 – 5.18 (br, 2H), 6.43 – 6.59 (br, 4H), 6.67 – 6.81 (br, 4H), 7.50 (s, 2H), 7.66 – 7.77 (br, 2H), 7.81 – 7.92 (br, 2H), 7.94 – 8.04 (br, 2H), 8.37 – 8.51 (m, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 28.2, 49.2, 50.0, 55.5, 64.8, 72.5, 75.5, 80.2, 114.9, 121.8, 122.8, 123.1, 126.1, 129.1, 130.3, 133.0, 135.8, 136.6, 142.1, 145.0, 158.0 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{46}H_{55}N_{10}O_{14}S_2]^+$ 1035.3341, gef. 1035.3424 | t_R = 7.17 min (90 %)

D | A41 | 4.8 mg (5.0 μ mol, 25 %) | $C_{32}H_{42}N_{10}O_{12}S_2$ | 1H -NMR: δ = 1.86 (q, J = 12.5 Hz, 2H), 2.42 – 2.51 (m, 1H), 3.28 – 3.36 (m, 2H), 3.41 – 3.48 (m, 2H), 3.56 – 3.61 (m, 2H), 3.61 – 3.68 (m, 4H), 4.89 (d, J = 12.3 Hz, 2H), 5.07 (d, J = 12.3 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.80 – 7.87 (m, 4H), 8.03 – 8.08 (m, 2H), 8.42 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 28.1, 49.0, 49.9, 64.6, 72.4, 75.4, 79.6, 118.5, 122.3, 122.8, 127.7, 129.0, 134.4, 134.8, 141.5, 144.4 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{32}H_{43}N_{10}O_{12}S_2]^+$ 823.2504, gef. 823.2558 | t_R = 3.85 min (99 %)

D | A42 | 2.2 mg (3.7 μ mol, 19 %) | $C_{27}H_{33}N_5O_6$ | 1H -NMR: δ = 1.72 (q, J = 12.6 Hz, 1H), 2.35 (dt, J = 12.7, 4.3 Hz, 1H), 3.21 (dd, J = 12.2, 4.3 Hz, 2H), 3.45 – 3.53 (m, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 5.00 (d, J = 12.1 Hz, 2H), 5.73 (s, 2H), 6.92 (s, 1H), 7.05 (dd, J = 9.1, 2.4 Hz, 2H), 7.10 (s, 1H), 7.17 (s, 1H), 7.61 (d, J = 9.0 Hz, 1H), 7.90 (s, 1H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 28.9, 49.2, 50.1, 52.5, 55.4, 55.4, 55.5, 64.9, 72.8, 75.5, 80.7, 102.6, 104.1, 108.2, 115.7, 123.0, 124.2, 2×124.8 , 126.0, 126.1, 126.2, 131.1, 144.0, 148.3, 148.4, 157.2 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{27}H_{34}N_5O_6]^+$ 524.2509, gef. 524.2518 | t_R = 7.09 min (> 99 %)

D | A43 | 13.7 mg (12.9 μ mol, 65 %) | $C_{36}H_{57}N_{15}O_9$ | 1H -NMR: δ = 1.82 (q, J = 12.5 Hz, 3H), 2.43 (dt, J = 12.5, 4.2 Hz, 3H), 3.24 – 3.31 (m, 3H), 3.33 – 3.40 (m, 3H), 3.52 – 3.65 (m, 9H), 4.87 (d, J = 12.1 Hz, 3H), 5.06 (d, J = 12.1 Hz, 3H), 5.58 (s, 6H), 7.15 (s, 3H), 8.04 (s, 3H) ppm | APT: δ = 28.2, 49.1, 49.9, 53.2, 64.8, 72.4, 75.3, 79.9, 125.5, 127.4, 136.6, 144.0 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{36}H_{58}N_{15}O_9]^+$ 844.4542, gef. 844.4582 | t_R = 2.76 min (61 %)

D* | A1 | 10.2 mg (12.6 μmol , 63 %) | $\text{C}_{30}\text{H}_{56}\text{N}_{10}\text{O}_7$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.41 – 1.53 (m, 4H), 1.74 (q, J = 12.4 Hz, 2H), 1.84 – 1.99 (m, 8H), 2.37 (dt, J = 12.4, 4.1 Hz, 2H), 2.80 (s, 4H), 3.18 – 3.25 (m, 2H), 3.26 – 3.32 (m, 2H), 3.33 – 3.38 (m, 2H), 3.40 (t, J = 6.4 Hz, 4H), 3.43 – 3.47 (m, 4H), 3.64 – 3.72 (m, 2H), 3.82 – 3.90 (m, 2H), 4.42 (t, J = 7.0 Hz, 4H), 8.03 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 20.2, 25.4, 25.9, 28.2, 28.4, 49.1, 49.9, 51.4, 69.5, 71.7, 72.5, 75.0, 80.3, 125.3, 136.1 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{30}\text{H}_{57}\text{N}_{10}\text{O}_7]^+$ 669.4412, gef. 669.4418 | t_R = 4.27 min (90 %)

D* | A2 | 13.6 mg (16.1 μmol , 81 %) | $\text{C}_{30}\text{H}_{56}\text{N}_{10}\text{O}_9$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.75 – 1.85 (m, 2H), 1.96 (d, J = 3.8 Hz, 4H), 2.46 (d, J = 10.1 Hz, 2H), 2.77 (s, 4H), 3.30 (s, 2H), 3.42 (q, J = 18.9, 14.2 Hz, 4H), 3.52 – 3.56 (m, 8H), 3.58 – 3.62 (m, 4H), 3.68 – 3.76 (m, 2H), 3.94 (d, J = 4.2 Hz, 6H), 4.54 – 4.60 (m, 4H), 7.83 (s, 2H) ppm | APT: δ = 20.9, 28.2, 29.0, 49.1, 49.2, 49.9, 68.7, 69.4, 69.6, 71.9, 72.5, 75.0, 80.4, 123.8, 137.0 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{30}\text{H}_{57}\text{N}_{10}\text{O}_9]^+$ 701.4310, gef. 701.4311 | t_R = 3.60 min (92 %)

D* | A3 | 4.95 mg (6.2 μmol , 31 %) | $\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{N}_{10}\text{O}_8$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.83 (q, J = 12.3 Hz, 2H), 1.90 – 2.01 (m, 4H), 2.42 – 2.52 (m, 2H), 2.78 (td, J = 7.5, 2.2 Hz, 4H), 3.28 – 3.35 (m, 2H), 3.35 – 3.47 (m, 4H), 3.52 – 3.57 (m, 4H), 3.73 (dt, J = 9.1, 6.5 Hz, 2H), 3.87 – 3.92 (m, 4H), 3.96 (dt, J = 9.2, 6.7 Hz, 2H), 4.52 – 4.58 (m, 4H), 7.78 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 20.9, 28.2, 29.0, 49.1, 49.9, 49.9, 68.7, 69.5, 71.9, 72.5, 75.0, 80.4, 123.6, 147.5 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{N}_{10}\text{O}_8\text{Na}]^+$ 679.3862, gef. 679.3834 | t_R = 3.60 min (89 %)

119

D* | A5 | 1.5 mg (1.7 μmol , 9 %) | $\text{C}_{36}\text{H}_{52}\text{N}_{10}\text{O}_6$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.72 – 1.86 (m, 2H), 1.90 – 2.04 (m, 4H), 2.38 – 2.50 (m, 2H), 2.75 – 2.88 (m, 4H), 3.24 – 3.37 (m, 4H), 3.37 – 3.44 (m, 2H), 3.48 – 3.57 (m, 4H), 3.68 – 3.76 (m, 2H), 3.92 – 4.01 (m, 2H), 5.64 (s, 4H), 7.44 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 7.71 (d, J = 8.2 Hz, 4H), 7.87 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 21.0, 28.5, 29.0, 49.1, 50.0, 53.4, 71.9, 72.7, 75.0, 80.6, 123.5, 127.5, 128.6, 134.6, 140.1, 147.8 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{36}\text{H}_{53}\text{N}_{10}\text{O}_6]^+$ 721.4150, gef. 721.4088 | t_R = 5.61 min (> 99 %)

D* | A6 | 6.2 mg (7.5 μmol , 37 %) | $\text{C}_{30}\text{H}_{56}\text{N}_{10}\text{O}_8$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.80 (s, 2H), 1.97 (s, 4H), 2.10 – 2.22 (m, 4H), 2.39 – 2.50 (m, 2H), 2.78 (s, 4H), 3.26 – 3.33 (m, 2H), 3.38 – 3.44 (m, 4H), 3.48 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 3.50 – 3.55 (m, 4H), 3.56 – 3.59 (m, 4H), 3.68 – 3.75 (m, 2H), 3.95 (s, 2H), 4.47 (t, J = 6.6 Hz, 4H), 7.82 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 20.9, 2 \times 28.9, 29.1, 47.3, 49.2, 50.3, 67.3, 69.3, 71.9, 72.6, 74.9, 80.6, 129.7, 137.2 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{30}\text{H}_{57}\text{N}_{10}\text{O}_8]^+$ 685.4360, gef. 685.4367 | t_R = 3.99 min (80 %)

D* | A8 | 3.55 mg (4.1 μmol , 21 %) | $\text{C}_{34}\text{H}_{48}\text{N}_{12}\text{O}_6$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.85 (q, J = 12.4 Hz, 2H), 2.01 – 2.12 (m, 4H), 2.49 (dt, J = 12.4, 4.2 Hz, 2H), 2.89 (t, J = 7.2 Hz, 4H), 3.33 (ddd, J = 12.5, 9.9, 4.3 Hz, 2H), 3.39 – 3.50 (m, 4H), 3.55 – 3.61 (m, 4H), 3.81 (dt, J = 9.3, 6.5 Hz, 2H), 4.00 – 4.07 (m, 2H), 7.94 (d, J = 8.9 Hz, 4H), 8.06 (d, J = 8.8 Hz, 4H), 8.35 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 21.0, 28.3, 28.9, 49.2, 49.9, 72.0, 72.6, 75.0, 80.5, 121.4, 121.5, 124.3,

135.9, 148.4, 151.7 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{34}H_{48}N_{12}O_6Na]^+$ 743.3717, gef. 743.3672 | $t_R = 6.65$ min (> 99 %)

D* | A9 | 7.4 mg (8.4 μ mol, 42 %) | $C_{35}H_{49}N_{11}O_7$ | 1H -NMR: $\delta = 1.77 - 1.86$ (m, 2H), 1.89 - 1.96 (m, 4H), 2.45 (dt, $J = 12.4, 4.1$ Hz, 2H), 2.61 - 2.70 (m, 4H), 3.27 - 3.39 (m, 4H), 3.41 - 3.47 (m, 2H), 3.52 - 3.57 (m, 4H), 3.71 - 3.77 (m, 2H), 3.91 - 3.99 (m, 2H), 7.42 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 7.52 - 7.60 (m, 4H), 7.77 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 8.00 (s, 1H), 8.12 (s, 1H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 2 \times 20.9, 2 \times 28.6, 2 \times 28.7, 2 \times 49.2, 2 \times 50.0, 2 \times 72.0, 2 \times 72.7, 2 \times 75.0, 2 \times 80.8, 2 \times 119.4, 2 \times 120.2, 120.6, 120.7, 2 \times 121.7, 2 \times 129.1, 132.3, 132.9, 137.6, 138.4, 147.9, 148.3, 166.1$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{35}H_{50}N_{11}O_7]^+$ 736.3895, gef. 736.3909 | $t_R = 5.46$ min (96 %)

D* | A10 | 11.9 mg (13.8 μ mol, 69 %) | $C_{36}H_{52}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: $\delta = 1.82$ (q, $J = 12.4$ Hz, 2H), 1.94 - 2.06 (m, 4H), 2.46 (dt, $J = 12.4, 4.1$ Hz, 2H), 2.74 (s, 4H), 2.77 - 2.83 (m, 4H), 3.26 - 3.33 (m, 2H), 3.33 - 3.41 (m, 2H), 3.42 - 3.48 (m, 2H), 3.51 - 3.59 (m, 4H), 3.74 - 3.83 (m, 2H), 3.97 - 4.04 (m, 2H), 7.10 - 7.16 (m, 2H), 7.18 - 7.23 (m, 2H), 7.27 (s, 2H), 7.37 - 7.45 (m, 4H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 20.9, 28.5, 28.9, 31.7, 49.2, 50.0, 72.1, 72.7, 75.0, 80.7, 124.6, 126.1, 127.4, 130.8, 131.1, 135.2, 136.3, 147.2$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{36}H_{53}N_{10}O_6]^+$ 721.4150, gef. 721.4174 | $t_R = 5.43$ min (> 99 %)

120

D* | A12 | 9.8 mg (12.1 μ mol, 61 %) | $C_{32}H_{46}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: $\delta = 1.84$ (q, $J = 12.4$ Hz, 2H), 2.05 - 2.20 (m, 4H), 2.48 (dt, $J = 12.4, 4.2$ Hz, 2H), 2.95 - 3.06 (m, 4H), 3.28 - 3.35 (m, 2H), 3.38 - 3.46 (m, 2H), 3.46 - 3.51 (m, 2H), 3.53 - 3.61 (m, 4H), 3.85 (dt, $J = 9.2, 6.5$ Hz, 2H), 4.04 - 4.13 (m, 2H), 7.70 - 7.79 (m, 4H), 7.82 (dd, $J = 6.8, 1.5$ Hz, 2H), 8.27 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 21.0, 28.2, 29.0, 49.2, 49.9, 72.1, 72.5, 75.0, 80.4, 124.7, 125.3, 126.1, 127.3, 129.1, 133.2, 147.9$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{32}H_{47}N_{10}O_6]^+$ 667.3680, gef. 667.3683 | $t_R = 4.47$ min (> 99 %)

D* | A13 | 6.9 mg (8.1 μ mol, 41 %) | $C_{34}H_{48}N_{10}O_7$ | 1H -NMR: $\delta = 1.83$ (q, $J = 12.4$ Hz, 2H), 1.96 - 2.10 (m, 4H), 2.39 - 2.54 (m, 2H), 2.81 - 2.93 (m, 4H), 3.26 - 3.34 (m, 2H), 3.36 - 3.49 (m, 4H), 3.50 - 3.58 (m, 4H), 3.73 - 3.80 (m, 2H), 3.96 - 4.05 (m, 2H), 7.26 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H), 7.71 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H), 8.19 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 20.9, 28.2, 28.9, 49.1, 49.9, 71.9, 72.5, 74.9, 80.4, 2 \times 120.0, 121.9, 122.8, 132.4, 148.4, 156.8$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{34}H_{49}N_{10}O_7]^+$ 709.3786, gef. 709.3803 | $t_R = 5.92$ min (> 99 %)

D* | A14 | 7.0 mg (8.2 μ mol, 41 %) | $C_{35}H_{50}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: $\delta = 1.79 - 1.86$ (m, 2H), 1.97 - 2.08 (m, 4H), 2.46 (dt, $J = 12.4, 4.0$ Hz, 2H), 2.83 - 2.88 (m, 4H), 3.27 - 3.33 (m, 2H), 3.33 - 3.40 (m, 2H), 3.42 - 3.48 (m, 2H), 3.51 - 3.58 (m, 4H), 3.74 - 3.81 (m, 2H), 3.97 - 4.03 (m, 2H), 7.44 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H), 7.60 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H), 8.16 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 20.9, 21.5, 22.2, 28.5, 28.9, 40.1, 44.5, 49.2, 50.0, 71.9, 72.7, 75.0, 80.7, 121.0, 121.6, 130.1, 134.7, 142.4, 148.1$ | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{35}H_{51}N_{10}O_6]^+$ 707.3993, gef. 707.3938 | $t_R = 6.24$ min (> 99 %)

D* | A16 | 1.75 mg (2.0 μ mol, 10 %) | $C_{35}H_{47}N_{11}O_6$ | 1H -NMR: δ = 1.85 (q, J = 12.3 Hz, 2H), 2.04 – 2.15 (m, 4H), 2.44 – 2.54 (m, 2H), 2.87 – 2.94 (m, 4H), 3.30 – 3.36 (m, 2H), 3.39 – 3.46 (m, 2H), 3.46 – 3.51 (m, 2H), 3.55 – 3.63 (m, 4H), 3.81 – 3.88 (m, 2H), 4.02 – 4.11 (m, 2H), 7.79 – 7.97 (m, 2H), 8.09 (dd, J = 5.7, 3.0 Hz, 2H), 8.15 – 8.24 (m, 2H), 8.46 (s, 2H), 8.91 – 9.03 (m, 1H) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{35}H_{47}N_{11}O_6Na]^+$ 740.3608, gef. 740.3555 | t_R = 6.41 min (98 %)

D* | A17 | 8.9 mg (10.5 μ mol, 52 %) | $C_{35}H_{48}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: δ = 1.84 – 1.99 (m, 6H), 2.52 (dt, J = 12.4, 4.1 Hz, 2H), 2.56 – 2.69 (m, 4H), 3.32 – 3.40 (m, 2H), 3.43 – 3.47 (m, 4H), 3.48 – 3.55 (m, 2H), 3.57 – 3.64 (m, 4H), 3.74 – 3.83 (m, 2H), 3.94 – 4.04 (m, 2H), 7.26 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.30 (s, 2H), 7.52 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 7.93 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 21.0, 28.2, 28.7, 36.5, 49.2, 50.0, 72.1, 72.6, 75.1, 80.4, 115.4, 118.1, 120.2, 120.9, 134.3, 140.1, 144.6, 147.8 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{35}H_{49}N_{10}O_6]^+$ 705.3837, gef. 705.3781 | t_R = 6.27 min (> 99 %)

D* | A18 | 7.1 mg (7.8 μ mol, 39 %) | $C_{40}H_{52}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: δ = 1.81 – 2.04 (m, 6H), 2.46 – 2.55 (m, 2H), 2.67 (s, 4H), 3.30 – 3.46 (m, 4H), 3.48 – 3.55 (m, 2H), 3.57 – 3.65 (m, 4H), 3.75 – 3.83 (m, 2H), 3.95 – 4.03 (m, 2H), 7.13 (s, 4H), 7.24 – 7.46 (m, 8H), 7.97 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 21.1, 28.5, 28.9, 49.3, 50.1, 72.1, 72.7, 75.1, 80.7, 119.7, 120.2, 126.7, 127.3, 135.0, 137.2, 139.1, 148.2 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{40}H_{53}N_{10}O_6]^+$ 769.4150, gef. 769.4092 | t_R = 7.34 min (> 99 %)

121

D* | A19 | 5.5 mg (6.4 μ mol, 32 %) | $C_{36}H_{52}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: δ = 1.81 – 1.89 (m, 2H), 2.02 (d, J = 6.2 Hz, 4H), 2.43 – 2.53 (m, 2H), 2.85 (d, J = 6.9 Hz, 4H), 3.00 (d, J = 6.2 Hz, 4H), 3.28 – 3.36 (m, 2H), 3.36 – 3.48 (m, 4H), 3.53 – 3.60 (m, 4H), 3.74 – 3.81 (m, 2H), 3.96 – 4.04 (m, 2H), 7.36 (d, J = 7.9 Hz, 4H), 7.55 (d, J = 7.8 Hz, 4H), 8.13 (d, J = 4.9 Hz, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 20.9, 28.3, 28.9, 36.1, 49.2, 49.9, 72.0, 72.6, 75.0, 80.5, 120.7, 121.6, 130.0, 134.4, 143.0, 148.1 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{36}H_{53}N_{10}O_6]^+$ 721.4150, gef. 721.4069 | t_R = 6.57 min (> 99 %)

D* | A20 | 8.0 mg (9.3 μ mol, 46 %) | $C_{36}H_{52}N_{10}O_6$ | 1H -NMR: δ = 1.86 (q, J = 12.4 Hz, 2H), 2.01 – 2.11 (m, 4H), 2.19 (s, 6H), 2.49 (dt, J = 12.4, 4.2 Hz, 2H), 2.92 (t, J = 7.3 Hz, 4H), 3.29 – 3.38 (m, 2H), 3.38 – 3.45 (m, 2H), 3.45 – 3.52 (m, 2H), 3.54 – 3.60 (m, 4H), 3.80 (dt, J = 9.2, 6.4 Hz, 2H), 3.98 – 4.07 (m, 2H), 7.44 (d, J = 7.9 Hz, 2H), 7.63 (d, J = 7.8 Hz, 2H), 7.70 (s, 2H), 8.03 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 16.8, 20.9, 28.2, 28.9, 49.2, 50.0, 72.0, 72.5, 75.0, 80.4, 125.0, 125.5, 126.3, 130.0, 134.2, 135.3, 141.1, 147.4 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{36}H_{53}N_{10}O_6]^+$ 721.4150, gef. 721.4087 | t_R = 5.98 min (> 99 %)

D* | A21 | 1.05 mg (1.1 μ mol, 5 %) | $C_{39}H_{55}N_{13}O_9$ | 1H -NMR: δ = 1.76 – 1.88 (m, 2H), 1.96 – 2.09 (m, 4H), 2.42 – 2.49 (m, 2H), 2.84 – 2.91 (m, 4H), 3.27 – 3.33 (m, 2H), 3.35 – 3.46 (m, 4H), 3.51 – 3.56 (m, 4H), 3.74 – 3.78 (m, 2H), 3.98 – 4.03 (m, 2H), 5.44 (s, 2H), 5.47 (s, 2H), 7.56 (d, J = 4.5 Hz, 4H), 7.69 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.91 (s, 2H), 7.93 (d, J = 8.7 Hz,

2H) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{39}H_{55}N_{13}O_9Na]^+$ 872.4143, gef. 872.4093 | t_R = 4.70 min (88 %)

D* | A22 | 13.6 mg (13,9 μ mol, 69 %) | $C_{40}H_{58}N_{12}O_8$ | 1H -NMR: δ = 1.82 (q, J = 12.4 Hz, 2H), 1.93 – 2.03 (m, 4H), 2.46 (dt, J = 12.4, 4.1 Hz, 2H), 2.82 (s, 4H), 3.26 – 3.32 (m, 2H), 3.33 – 3.39 (m, 2H), 3.41 – 3.46 (m, 2H), 3.50 – 3.56 (m, 4H), 3.73 (dt, J = 9.1, 6.4 Hz, 2H), 3.96 (dt, J = 9.1, 6.6 Hz, 2H), 5.36 (s, 4H), 7.18 – 7.33 (m, 8H), 7.91 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 20.8, 28.2, 28.7, 31.4, 49.1, 49.9, 52.3, 71.9, 72.5, 74.9, 80.3, 125.1, 126.9, 127.2, 128.1, 130.4, 133.1, 137.2, 144.0, 167.0 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{40}H_{59}N_{12}O_8]^+$ 835.4579, gef. 835.4532 | t_R = 5.40 min (94 %)

D* | A27 | 3.7 mg (3.6 μ mol, 18 %) | $C_{38}H_{54}N_{12}O_{10}S$ | 1H -NMR: δ = 1.84 (q, J = 12.4 Hz, 2H), 1.95 – 2.08 (m, 4H), 2.48 (dt, J = 12.4, 4.1 Hz, 2H), 2.82 – 2.90 (m, 4H), 3.31 (ddd, J = 12.6, 9.9, 4.4 Hz, 2H), 3.36 – 3.48 (m, 4H), 3.51 – 3.59 (m, 4H), 3.75 (dt, J = 9.2, 6.5 Hz, 2H), 3.99 (dt, J = 9.2, 6.6 Hz, 2H), 5.44 (s, 4H), 7.67 – 7.75 (m, 4H), 7.85 – 7.94 (m, 6H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 20.9, 28.2, 28.9, 49.1, 49.9, 52.4, 71.9, 72.5, 74.9, 80.3, 120.9, 124.8, 128.6, 135.2, 141.9, 144.6, 166.6 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{38}H_{55}N_{12}O_{10}S]^+$ 871.3885, gef. 871.3838 | t_R = 4.74 min (> 99 %)

D* | A34 | 3.8 mg (3,9 μ mol, 19 %) | $C_{40}H_{58}N_{12}O_8$ | 1H -NMR: δ = 1.82 (q, J = 12.3 Hz, 2H), 1.96 – 2.08 (m, 4H), 2.30 (s, 6H), 2.42 – 2.50 (m, 2H), 2.86 (td, J = 7.3, 3.0 Hz, 4H), 3.26 – 3.34 (m, 2H), 3.35 – 3.46 (m, 4H), 3.51 – 3.56 (m, 4H), 3.73 – 3.77 (m, 2H), 3.99 (dt, J = 9.1, 6.5 Hz, 2H), 5.50 (s, 4H), 7.40 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.54 – 7.58 (m, 2H), 7.63 – 7.66 (m, 2H), 7.93 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 16.9, 20.9, 28.2, 28.9, 49.1, 49.9, 52.1, 71.9, 72.5, 74.9, 80.4, 124.8, 125.0, 126.8, 129.2, 134.8, 139.1, 147.8, 167.4 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{40}H_{58}N_{12}O_8Na]^+$ 857.4398, gef. 857.4354 | t_R = 4.98 min (96 %)

D* | A35 | 8.3 mg (9.2 μ mol, 46 %) | $C_{34}H_{48}N_{10}O_8S$ | 1H -NMR: δ = 1.73 – 1.83 (m, 2H), 1.93 – 2.06 (m, 4H), 2.42 (d, J = 11.5 Hz, 2H), 2.74 – 2.86 (m, 4H), 3.23 – 3.36 (m, 4H), 3.37 – 3.44 (m, 2H), 3.48 – 3.56 (m, 4H), 3.71 – 3.78 (m, 2H), 3.93 – 4.00 (m, 2H), 7.89 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 8.06 (d, J = 8.6 Hz, 4H), 8.29 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 20.9, 28.7, 28.8, 49.2, 50.0, 71.9, 72.8, 75.0, 80.9, 121.1, 121.4, 129.6, 139.3, 140.2, 148.7 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{34}H_{49}N_{10}O_8S]^+$ 757.3456, gef. 757.3483 | t_R = 5.25 min (> 99 %)

D* | A36 | 9.4 mg (10.4 μ mol, 52 %) | $C_{34}H_{48}N_{10}O_8S$ | 1H -NMR: δ = 1.83 (q, J = 12.4 Hz, 2H), 1.95 – 2.02 (m, 4H), 2.46 (dt, J = 12.4, 4.1 Hz, 2H), 2.76 – 2.87 (m, 4H), 3.27 – 3.34 (m, 2H), 3.35 – 3.41 (m, 2H), 3.42 – 3.47 (m, 2H), 3.51 – 3.56 (m, 4H), 3.75 (dt, J = 9.2, 6.5 Hz, 2H), 3.97 (dt, J = 9.2, 6.7 Hz, 2H), 7.78 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.96 (d, J = 9.5 Hz, 2H), 8.04 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 8.25 (s, 2H), 8.28 (t, J = 1.9 Hz, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: δ = 20.9, 28.2, 28.8, 49.1, 49.9, 71.9, 72.5, 74.9, 80.3, 119.5, 121.5, 126.1, 128.0, 131.7, 137.2, 140.8, 148.5 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{34}H_{49}N_{10}O_8S]^+$ 757.3456, gef. 757.3476 | t_R = 5.30 min (> 99 %)

D* | A37 | 9.6 mg (9.8 μmol , 49 %) | $\text{C}_{40}\text{H}_{58}\text{N}_{12}\text{O}_8$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.84 (q, J = 12.4 Hz, 2H), 2.01 (dq, J = 14.1, 7.0 Hz, 4H), 2.48 (dt, J = 12.4, 4.1 Hz, 2H), 2.80 – 2.86 (m, 4H), 2.89 (s, 4H), 3.27 – 3.35 (m, 2H), 3.36 – 3.48 (m, 4H), 3.52 – 3.59 (m, 4H), 3.75 (dt, J = 9.2, 6.5 Hz, 2H), 3.95 – 4.03 (m, 2H), 5.36 (s, 4H), 7.20 (d, J = 8.1 Hz, 4H), 7.35 (d, J = 8.3 Hz, 4H), 7.85 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 20.9, 28.2, 28.9, 36.2, 49.1, 50.0, 52.4, 71.9, 72.5, 75.0, 80.4, 121.5, 124.8, 129.3, 134.1, 139.5, 147.8, 166.2 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{40}\text{H}_{59}\text{N}_{12}\text{O}_8]^+$ 835.4579, gef. 835.4494 | t_R = 5.89 min (93 %)

D* | A39 | 4.05 mg (4.2 μmol , 21 %) | $\text{C}_{38}\text{H}_{54}\text{N}_{12}\text{O}_9$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.83 (q, J = 12.4 Hz, 2H), 1.95 – 2.09 (m, 4H), 2.42 – 2.51 (m, 2H), 2.86 (td, J = 7.3, 2.8 Hz, 4H), 3.26 – 3.34 (m, 2H), 3.36 – 3.46 (m, 4H), 3.50 – 3.58 (m, 4H), 3.75 (d, J = 9.2 Hz, 2H), 3.99 (dt, J = 9.1, 6.5 Hz, 2H), 5.43 (s, 4H), 7.08 – 7.15 (m, 4H), 7.44 – 7.51 (m, 4H), 7.91 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 20.9, 28.2, 28.9, 49.1, 49.9, 52.3, 71.9, 72.5, 74.9, 80.3, 119.4, 123.8, 124.9, 131.9, 147.8, 154.4, 166.5 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{38}\text{H}_{55}\text{N}_{12}\text{O}_9]^+$ 823.4215, gef. 823.4169 | t_R = 5.28 min (93 %)

N | A1 | 17.8 mg (14.6 μmol , 73 %) | $\text{C}_{38}\text{H}_{72}\text{N}_{14}\text{O}_{13}$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.48 – 1.58 (m, 4H), 1.87 – 2.00 (m, 6H), 2.50 (dt, J = 12.5, 4.2 Hz, 2H), 3.31 – 3.41 (m, 4H), 3.43 – 3.52 (m, 9H), 3.53 – 3.62 (m, 6H), 3.70 (t, J = 9.2 Hz, 2H), 3.96 – 4.04 (m, 4H), 4.05 – 4.10 (m, 2H), 4.44 – 4.52 (m, 8H), 5.94 (d, J = 3.9 Hz, 2H), 8.19 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 25.5, 26.2, 28.2, 42.1, 47.6, 48.4, 49.6, 50.3, 53.4, 68.0, 68.9, 69.6, 70.9, 72.4, 75.1, 77.3, 95.8, 126.5, 137.4 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{38}\text{H}_{73}\text{N}_{14}\text{O}_{13}]^+$ 933.5482, gef. 933.5505 | t_R = 3.63 min (96 %)

123

N | A2 | 19.6 mg (15.7 μmol , 78 %) | $\text{C}_{38}\text{H}_{72}\text{N}_{14}\text{O}_{15}$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.92 (q, J = 12.6 Hz, 2H), 2.51 (dt, J = 12.5, 4.2 Hz, 2H), 3.32 – 3.43 (m, 4H), 3.44 – 3.52 (m, 4H), 3.55 – 3.61 (m, 9H), 3.62 – 3.66 (m, 4H), 3.70 (t, J = 9.2 Hz, 2H), 3.96 – 4.05 (m, 8H), 4.05 – 4.11 (m, 2H), 4.43 – 4.58 (m, 4H), 4.64 – 4.69 (m, 4H), 5.95 (d, J = 3.9 Hz, 2H), 8.23 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 28.2, 42.0, 47.6, 48.4, 49.7, 50.1, 53.4, 68.0, 68.6, 68.9, 69.4, 69.5, 70.9, 72.4, 75.1, 77.3, 95.8, 126.9, 137.5 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{38}\text{H}_{73}\text{N}_{14}\text{O}_{15}]^+$ 965.5380, gef. 965.5416 | t_R = 3.06 min (96 %)

N | A3 | 18.1 mg (15.0 μmol , 75 %) | $\text{C}_{36}\text{H}_{68}\text{N}_{14}\text{O}_{14}$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.84 (q, J = 12.6 Hz, 2H), 2.49 (dt, J = 12.4, 4.1 Hz, 2H), 3.23 – 3.34 (m, 4H), 3.36 – 3.43 (m, 4H), 3.45 – 3.54 (m, 10H), 3.62 (t, J = 9.2 Hz, 2H), 3.83 – 3.87 (m, 4H), 3.88 – 3.96 (m, 4H), 3.97 – 4.03 (m, 2H), 4.38 – 4.45 (m, 4H), 4.55 (s, 4H), 5.86 (d, J = 3.9 Hz, 2H), 8.14 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 28.2, 42.1, 47.6, 48.4, 49.7, 50.1, 53.4, 68.1, 68.6, 68.9, 69.5, 70.9, 72.5, 75.2, 77.3, 95.8, 126.9, 137.5 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{36}\text{H}_{69}\text{N}_{14}\text{O}_{14}]^+$ 921.5118, gef. 921.5129 | t_R = 2.74 min (96 %)

N-Mono | A5 | 3.7 mg (4.8 μmol , 24 %) | $\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{N}_{10}\text{O}_6$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.82 (q, J = 12.4 Hz, 1H), 2.39 – 2.48 (m, 1H), 3.27 – 3.36 (m, 2H), 3.39 – 3.48 (m, 3H), 3.49 – 3.58 (m, 2H),

3.66 (t, $J = 9.2$ Hz, 1H), 3.88 (t, $J = 9.5$ Hz, 1H), 3.93 (dd, $J = 10.9, 9.1$ Hz, 1H), 4.01 – 4.08 (m, 1H), 4.39 – 4.48 (m, 4H), 5.71 (s, 2H), 5.87 (d, $J = 3.8$ Hz, 1H), 7.49 (dd, $J = 21.5, 8.3$ Hz, 4H), 7.72 (dd, $J = 8.3, 4.4$ Hz, 4H), 8.21 (s, 1H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.9, 42.0, 47.6, 48.4, 49.8, 53.5, 2 \times 53.7, 53.8, 68.3, 69.0, 70.9, 72.6, 75.2, 96.0, 126.4, 127.3, 127.5, 128.8, 129.2, 134.0, 135.3, 138.3, 139.7, 140.4$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{29}\text{H}_{41}\text{N}_{10}\text{O}_6]^+$ 625.3210, gef. 625.3221 | $t_R = 7.09$ min ($> 99\%$)

N | A5 | 4.2 mg (3.3 μmol , 17 %) | $\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{N}_{14}\text{O}_{12}$ | ^1H -NMR: $\delta = 1.82$ (q, $J = 12.4$ Hz, 2H), 2.39 – 2.48 (m, 2H), 3.27 – 3.36 (m, 4H), 3.39 – 3.48 (m, 6H), 3.49 – 3.58 (m, 4H), 3.66 (t, $J = 9.2$ Hz, 2H), 3.88 (t, $J = 9.5$ Hz, 2H), 3.93 (dd, $J = 10.9, 9.1$ Hz, 2H), 4.01 – 4.08 (m, 2H), 4.39 – 4.48 (m, 8H), 5.71 (s, 4H), 5.87 (d, $J = 3.8$ Hz, 2H), 7.49 (dd, $J = 21.5, 8.3$ Hz, 8H), 7.72 (dd, $J = 8.3, 4.4$ Hz, 8H), 8.21 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.2, 42.0, 47.5, 48.4, 49.6, 53.4, 53.7, 62.5, 68.1, 68.9, 70.8, 72.5, 75.1, 77.5, 95.9, 126.7, 127.6, 128.8, 134.1, 137.7, 140.2$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{44}\text{H}_{69}\text{N}_{14}\text{O}_{12}]^+$ 985.5219, gef. 985.5229 | $t_R = 4.70$ min ($> 99\%$)

124

N | A6 | 13.0 mg (10.5 μmol , 53 %) | $\text{C}_{38}\text{H}_{72}\text{N}_{14}\text{O}_{14}$ | ^1H -NMR: $\delta = 1.83$ (q, $J = 12.6$ Hz, 2H), 2.06 – 2.17 (m, 4H), 2.42 (dt, $J = 12.5, 4.2$ Hz, 2H), 3.23 – 3.34 (m, 4H), 3.38 (dd, $J = 11.1, 3.9$ Hz, 2H), 3.40 – 3.46 (m, 6H), 3.46 – 3.55 (m, 10H), 3.62 (t, $J = 9.2$ Hz, 2H), 3.89 – 3.95 (m, 4H), 3.97 – 4.03 (m, 2H), 4.37 – 4.44 (m, 4H), 4.47 (t, $J = 6.9$ Hz, 4H), 5.86 (d, $J = 3.8$ Hz, 2H), 8.12 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.2, 29.2, 42.1, 47.6, 47.7, 48.4, 49.7, 53.4, 67.2, 68.1, 68.9, 69.3, 70.9, 72.5, 75.2, 77.4, 95.9, 126.6, 137.5$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{38}\text{H}_{73}\text{N}_{14}\text{O}_{14}]^+$ 949.5431, gef. 949.5431 | $t_R = 3.52$ min (24 %)

N | A8 | 7.4 mg (5.8 μmol , 29 %) | $\text{C}_{42}\text{H}_{64}\text{N}_{16}\text{O}_{12}$ | ^1H -NMR: $\delta = 1.93$ (q, $J = 12.6$ Hz, 2H), 2.48 – 2.55 (m, 2H), 3.33 – 3.39 (m, 2H), 3.46 – 3.53 (m, 4H), 3.53 – 3.63 (m, 6H), 3.63 – 3.75 (m, 4H), 3.98 – 4.06 (m, 4H), 4.10 – 4.16 (m, 2H), 4.59 – 4.66 (m, 4H), 5.97 (d, $J = 3.8$ Hz, 2H), 8.03 – 8.10 (m, 2H), 8.12 – 8.19 (m, 2H), 8.78 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.2, 42.1, 47.7, 48.4, 48.8, 49.6, 53.4, 68.1, 68.9, 70.9, 72.5, 75.1, 77.5, 95.9, 122.0, 124.3, 125.1, 138.2, 138.4, 152.2$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{42}\text{H}_{65}\text{N}_{16}\text{O}_{12}]^+$ 985.4968, gef. 985.4966 | $t_R = 5.68$ min (98 %)

N | A9 | 20.2 mg (15.7 μmol , 78 %) | $\text{C}_{43}\text{H}_{65}\text{N}_{15}\text{O}_{13}$ | ^1H -NMR: $\delta = 1.84$ (q, $J = 12.5$ Hz, 2H), 2.37 – 2.46 (m, 2H), 3.23 – 3.30 (m, 2H), 3.38 – 3.41 (m, 2H), 3.44 – 3.54 (m, 6H), 3.54 – 3.60 (m, 2H), 3.62 (t, $J = 9.2$ Hz, 2H), 3.90 – 3.98 (m, 4H), 3.99 – 4.07 (m, 2H), 4.48 (s, 4H), 5.88 (d, $J = 3.7$ Hz, 2H), 7.69 (s, 4H), 7.84 (s, 2H), 7.96 (s, 2H), 8.54 (s, 1H), 8.65 (s, 1H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.3, 42.1, 47.7, 47.7, 48.4, 49.7, 53.4, 62.5, 62.5, 68.1, 69.0, 70.9, 72.5, 75.2, 77.4, 95.8, 120.9, 121.7, 122.9, 124.9, 125.0, 129.4, 132.9, 134.4, 138.2, 138.5, 138.6, 167.7$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{43}\text{H}_{66}\text{N}_{15}\text{O}_{13}]^+$ 1000.4965, gef. 1000.4989 | $t_R = 4.79$ min ($> 99\%$)

N | A10 | 10.3 mg (8.1 μmol , 41 %) | $\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{N}_{14}\text{O}_{12}$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.85 (q, J = 12.6 Hz, 2H), 2.43 (dt, J = 12.4, 4.2 Hz, 2H), 2.67 (s, 4H), 3.27 (ddd, J = 12.4, 10.5, 4.2 Hz, 2H), 3.32 – 3.40 (m, 4H), 3.41 – 3.52 (m, 6H), 3.53 – 3.55 (m, 1H), 3.56 – 3.57 (m, 1H), 3.62 (t, J = 9.2 Hz, 2H), 3.90 – 4.00 (m, 4H), 4.00 – 4.07 (m, 2H), 4.43 (s, 4H), 5.89 (d, J = 3.9 Hz, 2H), 7.07 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 7.20 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 7.32 – 7.38 (m, 4H), 7.77 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 28.2, 31.6, 41.9, 47.7, 48.4, 49.6, 53.4, 68.1, 68.9, 70.9, 72.5, 75.2, 77.2, 95.8, 126.3, 127.5, 128.0, 131.0, 131.1, 134.8, 136.3, 137.3 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{44}\text{H}_{69}\text{N}_{14}\text{O}_{12}]^+$ 985.5219, gef. 985.5241 | t_R = 4.70 min (95 %)

N | A17 | 7.1 mg (5.7 μmol , 28 %) | $\text{C}_{43}\text{H}_{64}\text{N}_{14}\text{O}_{12}$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.93 (q, J = 12.6 Hz, 2H), 2.47 – 2.55 (m, 2H), 3.34 (s, 2H), 3.46 – 3.52 (m, 4H), 3.53 – 3.64 (m, 6H), 3.65 – 3.75 (m, 4H), 3.97 – 4.07 (m, 4H), 4.12 (s, 4H), 4.59 (d, J = 3.3 Hz, 4H), 5.97 (d, J = 3.8 Hz, 2H), 7.80 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.99 (s, 2H), 8.06 (d, J = 8.3 Hz, 2H), 8.68 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 28.3, 36.9, 42.1, 47.7, 48.4, 49.7, 53.4, 68.1, 69.0, 70.9, 72.5, 75.2, 77.4, 95.9, 118.0, 120.2, 121.6, 125.1, 135.2, 138.1, 141.3, 145.6 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{43}\text{H}_{65}\text{N}_{14}\text{O}_{12}]^+$ 969.4906, gef. 969.4920 | t_R = 5.30 min (98 %)

N | A20 | 8.6 mg (6.8 μmol , 34 %) | $\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{N}_{14}\text{O}_{12}$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.93 (q, J = 12.6 Hz, 2H), 2.25 (s, 6H), 2.52 (dt, J = 12.4, 4.2 Hz, 2H), 3.32 – 3.40 (m, 2H), 3.46 – 3.53 (m, 4H), 3.53 – 3.65 (m, 6H), 3.66 – 3.74 (m, 4H), 3.98 – 4.07 (m, 4H), 4.11 – 4.17 (m, 2H), 4.63 (m, J = 2.1 Hz, 3H), 5.97 (d, J = 3.8 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.77 (dd, J = 8.2, 1.8 Hz, 2H), 7.86 (d, J = 1.5 Hz, 2H), 8.50 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 16.8, 28.3, 42.1, 47.7, 48.4, 49.7, 53.4, 68.1, 69.0, 70.9, 72.5, 75.2, 77.5, 95.9, 125.7, 126.6, 128.2, 130.2, 134.7, 135.1, 137.7, 141.6 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{44}\text{H}_{69}\text{N}_{14}\text{O}_{12}]^+$ 985.5219, gef. 985.5229 | t_R = 5.04 min (> 99 %)

N | A21 | 5.8 mg (4.1 μmol , 21 %) | $\text{C}_{47}\text{H}_{71}\text{N}_{17}\text{O}_{15}$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.91 (q, J = 12.6 Hz, 2H), 2.50 (dt, J = 12.4, 4.2 Hz, 2H), 3.32 – 3.38 (m, 2H), 3.41 – 3.53 (m, 4H), 3.54 – 3.66 (m, 8H), 3.70 (t, J = 9.2 Hz, 2H), 3.95 – 4.03 (m, 4H), 4.06 – 4.12 (m, 2H), 4.49 – 4.59 (m, 4H), 5.51 (s, 4H), 5.94 (d, J = 3.8 Hz, 2H), 7.04 – 7.14 (m, 4H), 7.42 – 7.50 (m, 4H), 8.30 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}^*$: δ = 2×28.2 , 2×42.0 , 2×47.6 , 2×48.3 , 2×48.8 , 2×49.6 , 2×53.4 , 2×68.1 , 2×68.9 , 2×70.9 , 2×72.4 , 2×75.1 , 2×77.6 , 2×96.0 , 2×120.8 , 2×122.4 , 2×123.5 , 2×128.7 , 130.4, 136.7, 166.2, 166.3, 168.9 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{47}\text{H}_{72}\text{N}_{17}\text{O}_{15}]^+$ 1114.5394, gef. 1114.5387 | t_R = 3.96 min (92 %)

N | A22 | 12.8 mg (9.2 μmol , 46 %) | $\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{N}_{16}\text{O}_{14}$ | $^1\text{H-NMR}$: δ = 1.90 (q, J = 12.6 Hz, 2H), 2.50 (dt, J = 12.5, 4.2 Hz, 2H), 2.87 (s, 4H), 3.31 – 3.38 (m, 2H), 3.39 – 3.51 (m, 6H), 3.52 – 3.64 (m, 6H), 3.70 (t, J = 9.2 Hz, 2H), 3.95 – 4.03 (m, 4H), 4.06 – 4.11 (m, 2H), 4.51 (d, J = 1.5 Hz, 4H), 5.45 (s, 4H), 5.93 (d, J = 3.9 Hz, 2H), 7.23 – 7.32 (m, 8H), 8.28 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: δ = 28.2, 31.5, 42.0, 46.6, 48.4, 49.6, 52.2, 53.4, 68.0, 68.9, 70.9, 72.4, 75.1, 77.4,

* C_q -Signale fehlen

95.9, 126.9, 127.3, 2×128.1 , 130.5, 133.1, 137.2, 137.8, 167.0 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{48}\text{H}_{75}\text{N}_{16}\text{O}_{14}]^+$ 1099.5648, gef. 1099.5653 | $t_R = 4.55$ min (91 %)

N | A27 | 12.9 mg (9.1 μmol , 45 %) | $\text{C}_{46}\text{H}_{70}\text{N}_{16}\text{O}_{16}\text{S}$ | $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 1.91$ (q, $J = 12.6$ Hz, 2H), 2.51 (dt, $J = 12.5, 4.2$ Hz, 2H), 3.33 (s, 2H), 3.41 – 3.49 (m, 4H), 3.52 – 3.66 (m, 8H), 3.70 (t, $J = 9.2$ Hz, 2H), 3.96 – 4.04 (m, 4H), 4.06 – 4.13 (m, 2H), 4.50 – 4.58 (m, 4H), 5.54 (s, 4H), 5.94 (d, $J = 3.8$ Hz, 2H), 7.71 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H), 7.90 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H), 8.29 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 28.2, 42.0, 47.6, 48.4, 48.8, 49.6, 52.6, 53.4, 68.0, 68.9, 70.9, 72.4, 75.1, 77.5, 95.9, 121.0, 128.2, 128.7, 135.2, 141.9, 166.4$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{46}\text{H}_{71}\text{N}_{16}\text{O}_{16}\text{S}]^+$ 1135.4955, gef. 1135.4977 | $t_R = 4.00$ min (92 %)

N | A31 | 11.4 mg (9.5 μmol , 48 %) | $\text{C}_{38}\text{H}_{64}\text{N}_{14}\text{O}_{12}$ | $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 1.93$ (q, $J = 12.6$ Hz, 2H), 2.52 (dt, $J = 12.4, 4.2$ Hz, 2H), 3.32 – 3.43 (m, 4H), 3.44 – 3.53 (m, 4H), 3.54 – 3.66 (m, 6H), 3.71 (t, $J = 9.2$ Hz, 2H), 3.96 – 4.05 (m, 4H), 4.05 – 4.12 (m, 2H), 4.49 (d, $J = 1.4$ Hz, 4H), 5.68 (s, 4H), 5.95 (d, $J = 3.8$ Hz, 2H), 7.31 – 7.38 (m, 3H), 7.42 – 7.50 (m, 1H), 8.24 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 28.2, 29.6, 42.0, 47.6, 48.4, 49.6, 53.4, 53.7, 68.0, 68.9, 70.9, 72.4, 75.1, 77.4, 95.9, 126.8, 127.8, 128.3, 129.9, 135.4, 137.7$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{38}\text{H}_{65}\text{N}_{14}\text{O}_{12}]^+$ 909.4906, gef. 909.4916 | $t_R = 3.33$ min (93 %)

N | A32 | 12.3 mg (9.2 μmol , 46 %) | $\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{N}_{16}\text{O}_{14}$ | $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 1.87$ (q, $J = 12.6$ Hz, 2H), 2.46 (dt, $J = 12.5, 4.2$ Hz, 2H), 3.30 – 3.36 (m, 2H), 3.43 – 3.48 (m, 4H), 3.50 – 3.61 (m, 6H), 3.61 – 3.72 (m, 4H), 3.95 – 4.01 (m, 4H), 4.04 – 4.11 (m, 2H), 4.52 – 4.59 (m, 4H), 5.79 (s, 3H), 5.93 (d, $J = 3.8$ Hz, 2H), 7.50 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 7.57 – 7.65 (m, 2H), 8.04 (d, $J = 7.4$ Hz, 2H), 8.39 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 28.2, 42.1, 47.7, 48.4, 49.6, 52.4, 53.4, 68.0, 68.9, 70.9, 72.4, 75.1, 77.4, 95.9, 125.3, 126.1, 127.3, 128.5, 129.3, 129.6, 135.7, 137.7, 167.8$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{44}\text{H}_{69}\text{N}_{16}\text{O}_{14}]^+$ 1045.5179, gef. 1045.5203 | $t_R = 3.66$ min (99 %)

N | A33 | 16.6 mg (12.5 μmol , 62 %) | $\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{N}_{16}\text{O}_{14}$ | $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 1.80$ (q, $J = 12.6$ Hz, 2H), 2.35 – 2.43 (m, 2H), 3.21 – 3.28 (m, 2H), 3.34 – 3.39 (m, 4H), 3.41 – 3.51 (m, 6H), 3.52 – 3.55 (m, 2H), 3.60 (t, $J = 9.2$ Hz, 2H), 3.86 – 3.93 (m, 4H), 3.96 – 4.02 (m, 2H), 4.42 – 4.49 (m, 4H), 5.62 – 5.68 (m, 4H), 5.84 (d, $J = 3.8$ Hz, 2H), 7.52 – 7.64 (m, 4H), 7.93 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 8.28 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 28.2, 42.1, 47.6, 47.7, 48.4, 49.7, 52.3, 53.4, 68.1, 68.9, 70.9, 72.4, 75.1, 77.4, 95.9, 122.3, 124.9, 126.6, 128.2, 129.7, 131.5, 137.8, 167.9$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{44}\text{H}_{69}\text{N}_{16}\text{O}_{14}]^+$ 1045.5179, gef. 1045.5190 | $t_R = 2.91/3.31$ (41/45 % bi/monovalentes Konjugat)

N | A34 | 13.6 mg (9.8 μmol , 49 %) | $\text{C}_{48}\text{H}_{74}\text{N}_{16}\text{O}_{14}$ | $^1\text{H-NMR}$: $\delta = 1.90$ (q, $J = 12.6$ Hz, 2H), 2.31 (s, 6H), 2.50 (dt, $J = 12.5, 4.2$ Hz, 2H), 3.31 – 3.38 (m, 2H), 3.43 – 3.46 (m, 2H), 3.46 – 3.49 (m, 2H), 3.49 – 3.60 (m, 6H), 3.61 – 3.64 (m, 2H), 3.70 (t, $J = 9.2$ Hz, 2H), 3.95 – 4.03 (m, 4H), 4.06 – 4.12 (m, 2H), 4.48 – 4.59 (m, 4H), 5.61 (s, 4H), 7.40 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.55 (dd, $J = 8.2, 1.9$ Hz, 2H), 7.64 (d, $J = 1.7$ Hz, 2H), 8.33 (s, 2H) ppm | $^{13}\text{C-NMR}$: $\delta = 17.0,$

28.2, 42.1, 47.7, 48.4, 49.7, 52.2, 53.4, 68.1, 68.9, 70.9, 72.4, 75.1, 77.5, 95.9, 125.0, 126.8, 128.1, 129.2, 133.2, 134.8, 137.8, 139.1, 167.1 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{48}H_{75}N_{16}O_{14}]^+$ 1099.5648, gef. 1099.5664 | $t_R = 4.14$ min (92 %)

N | A35 | 15.1 mg (11.5 μ mol, 58 %) | $C_{42}H_{64}N_{14}O_{14}S$ | 1H -NMR: $\delta = 1.92$ (q, $J = 12.6$ Hz, 2H), 2.51 (dt, $J = 12.5, 4.2$ Hz, 2H), 3.36 (ddd, $J = 12.4, 10.5, 4.3$ Hz, 2H), 3.45 – 3.51 (m, 4H), 3.52 – 3.63 (m, 6H), 3.64 – 3.68 (m, 3H), 3.71 (t, $J = 9.2$ Hz, 2H), 3.98 – 4.06 (m, 5H), 4.09 – 4.14 (m, 2H), 4.56 – 4.65 (m, 4H), 5.96 (d, $J = 3.8$ Hz, 2H), 8.11 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H), 8.27 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H), 8.79 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.2, 42.0, 47.7, 48.4, 49.7, 53.4, 68.1, 68.9, 70.9, 72.5, 75.2, 77.4, 95.9, 122.0, 125.2, 129.7, 138.6, 139.8, 140.2$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{42}H_{65}N_{14}O_{14}S]^+$ 1021.4525, gef. 1021.4549 | $t_R = 4.58$ min (91 %)

N | A36 | 6.3 mg (4.8 μ mol, 24 %) | $C_{42}H_{64}N_{14}O_{14}S$ | 1H -NMR: $\delta = 1.80 - 1.96$ (m, 2H), 2.49 (d, $J = 12.1$ Hz, 2H), 3.31 – 3.38 (m, 2H), 3.42 – 3.49 (m, 4H), 3.49 – 3.65 (m, 8H), 3.70 (t, $J = 9.0$ Hz, 2H), 3.93 – 4.04 (m, 4H), 4.10 (t, $J = 7.1$ Hz, 2H), 4.58 (s, 4H), 5.94 (d, $J = 3.1$ Hz, 2H), 7.87 (t, $J = 8.1$ Hz, 2H), 8.17 (dd, $J = 14.8, 7.9$ Hz, 4H), 8.54 (s, 2H), 8.76 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.5, 42.1, 47.7, 48.4, 49.7, 53.4, 62.5, 68.2, 69.0, 70.9, 72.5, 75.2, 77.8, 95.9, 120.2, 125.2, 126.9, 128.7, 131.8, 137.0, 138.9, 140.9$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{42}H_{65}N_{14}O_{14}]^+$ 1021.4525, gef. 1021.4539 | $t_R = 4.59$ min (99 %)

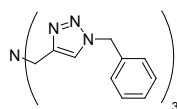
N | A37 | 14.5 mg (10.5 μ mol, 52 %) | $C_{48}H_{74}N_{16}O_{14}$ | 1H -NMR: $\delta = 1.82$ (q, $J = 12.6$ Hz, 2H), 2.42 (dt, $J = 12.5, 4.2$ Hz, 2H), 2.84 (s, 4H), 3.23 – 3.30 (m, 2H), 3.34 – 3.45 (m, 6H), 3.47 – 3.56 (m, 6H), 3.61 (t, $J = 9.2$ Hz, 2H), 3.88 – 3.96 (m, 4H), 3.99 – 4.04 (m, 2H), 4.45 (d, $J = 2.8$ Hz, 4H), 5.41 (s, 4H), 5.85 (d, $J = 3.9$ Hz, 2H), 7.16 (d, $J = 8.6$ Hz, 4H), 7.28 (d, $J = 8.5$ Hz, 4H), 8.20 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.2, 36.2, 42.0, 47.6, 48.4, 49.6, 52.5, 53.4, 68.0, 68.9, 70.9, 72.4, 75.1, 77.5, 95.9, 121.7, 122.7, 128.1, 129.3, 134.0, 137.7, 139.7, 166.0$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{48}H_{75}N_{16}O_{14}]^+$ 1099.5648, gef. 1099.5645 | $t_R = 5.21$ min (76 %)

N | A39 | 12.5 mg (9.1 μ mol, 46 %) | $C_{46}H_{70}N_{16}O_{15}$ | 1H -NMR: $\delta = 1.91$ (q, $J = 12.6$ Hz, 2H), 2.50 (dt, $J = 12.4, 4.2$ Hz, 2H), 3.32 – 3.38 (m, 2H), 3.41 – 3.53 (m, 6H), 3.54 – 3.66 (m, 6H), 3.70 (t, $J = 9.2$ Hz, 2H), 3.95 – 4.03 (m, 4H), 4.06 – 4.12 (m, 2H), 4.49 – 4.59 (m, 4H), 5.51 (s, 4H), 5.94 (d, $J = 3.8$ Hz, 2H), 7.04 – 7.14 (m, 4H), 7.42 – 7.50 (m, 4H), 8.30 (s, 2H) ppm | ^{13}C -NMR: $\delta = 28.3, 42.1, 47.7, 48.4, 52.5, 53.4, 68.1, 69.0, 70.9, 72.5, 75.2, 77.5, 96.0, 119.4, 123.8, 128.1, 131.8, 137.8, 154.4, 166.2$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{46}H_{71}N_{16}O_{15}]^+$ 1087.5286, gef. 1087.5280 | $t_R = 4.49$ min (88 %)

Benzylazid

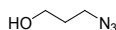
In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde Benzylbromid (10.0 g, 7.00 ml, 58.2 mmol) mit 100 ml wasserfreiem DMF verdünnt. Zu dieser Lösung wurden NaN₃ (4.00 g, 61.4 mmol) sowie eine Spatelspitze Dicyclohexano-18-Krone-6 addiert. Nach 24 h Rühren bei 40 °C wurde die Reaktionslösung auf 300 ml einer Mischung aus H₂O und Et₂O (2:1, v/v), gegossen und die wässrige Phase mit 2 × 100 ml Et₂O extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet und unter reduziertem Druck eingeeengt.

7.59 g (51.1 mmol, 98 %) hellgelbes Öl | C₇H₇N₃ | *R_f* = 0.22, 10 % EtOAc in Cyclohexan | ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 4.34 (s, 2H, N₃-CH₂), 7.24 – 7.51 (m, 5H, Ar-CH) ppm | ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 54.7 (N₃-CH₂), 128.1 (Ar-CH), 128.2 (Ar-CH), 128.7 (Ar-CH), 135.2 (Ar-C_q) ppm | EI-HRMS *m/z* ber. für [C₇H₇N₃]⁺ 133.0640, gef. 133.0640

Tris[(1-benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin TBTA^[101a]

- 128 Trispropargylamin (1.53 g, 1.65 ml, 11.7 mmol) wurde mit 18 ml MeCN verdünnt. Zu dieser Lösung wurden nacheinander Benzylazid (7.00 g, 52.6 mmol), 2,6-Lutidin (1.15 g, 1.25 ml, 10.8 mmol) und bei 0 °C [Cu(MeCN)₄]PF₆ (0.17 g, 0.45 mmol) hinzugefügt. Nach 3 d Rühren bei RT wurde der ausgefallene Niederschlag abfiltriert, mit 100 ml kaltem MeCN gewaschen und auf Kieselgel immobilisiert. Verunreinigungen wurden mittels einer säulenchromatografischen Reinigung an Kieselgel mit dem Stufengradienten 0→3 % MeOH in CH₂Cl₂ entfernt.

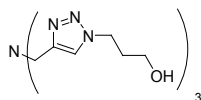
5.05 g (9.52 mmol, 82 %) cremefarbener Feststoff | C₃₀H₃₀N₁₀ | *R_f* = 0.45, 2 % MeOH in CH₂Cl₂ | ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 3.69 (s, 6H N-CH₂), 5.46 (s, 6H, NNN-CH₂), 7.19 – 7.25 (m, 6H, Ar-CH), 7.30 (dd, *J* = 5.5, 1.4 Hz, 9H, Ar-CH), 7.65 (s, 3H, =CH) ppm | ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 46.8 (N-CH₂), 53.8 (NNN-CH₂), 123.5 (=CH), 127.7 (Ar-CH), 128.4 (Ar-CH), 128.8 (Ar-CH), 134.5 (Ar-C_q), 144.0 (=C_q) ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₃₀H₃₁N₁₀]⁺ 531.2733, gef. 531.2730.

3-Azidopropanol^[101a]

Zu einer Lösung aus 3-Chloropropanol (15.0 g, 13.3 ml, 159 mmol) in 300 ml wasserfreiem DMF wurde unter Argon-Schutzgasatmosphäre eine Spatelspitze Dicyclohexano-18-Krone-6 sowie NaN₃ (15.5 g, 283 mmol) zugefügt. Die Reaktionslösung

wurde für 72 h bei 60 °C gerührt, anschließend mit 200 ml H₂O verdünnt, und die wässrige Phase mit 3 × 150 ml Et₂O extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum eingengt. Trotz Et₂O-Extraktion wurde DMF nicht vollständig entfernt.

Tris[(1-hydroxypropyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin THPTA^[101a]



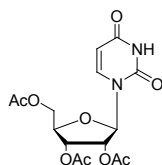
3-Azidopropanol (5.60g, 14.4 mmol mit 74 m% DMF) wurde mit 18 ml MeCN verdünnt und Trispropargylamin (1.66 g, 1.79 ml, 12.0 mmol) sowie 2,6- Lutidin (1.32 g, 1.43 ml, 12.0 mmol) addiert. Nach Abkühlen der Lösung auf 0 °C wurde [Cu(MeCN)₄]PF₆ (0.18 g, 0.48 mmol) zugesetzt und die Lösung für 24 h bei RT gerührt. Dabei färbte sich die Lösung erst grün, dann schwarz. Nach Entfernen aller flüchtigen Bestandteile im Vakuum, wurde das Rohprodukt säulenchromatografisch an Kieselgel mit dem Stufengradienten 5→10→15→30 % EtOH in CH₂Cl₂ gereinigt. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden im Vakuum bis zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde mit MeCN überschichtet und für 30 min bei 4 °C stehengelassen. Dabei fiel aus der gelben Lösung ein farbloser Feststoff aus, der durch Zentrifugierung und Dekantieren separiert und abschließend im Feinvakuum getrocknet wurde.

129

3.72 g (8.57 mmol, 71 %) farbloser Feststoff | C₁₈H₃₀N₁₀O₃ | *R*_f = 0.41, 20 % MeOH in CH₂Cl₂ | ¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): δ = 2.11 (t, *J* = 6.5 Hz, 6H, -CH₂-), 3.56 (t, *J* = 6.2 Hz, 6H, O-CH₂), 3.80 (s, 6H, N-CH₂), 4.48 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, NNN-CH₂), 7.93 (s, 3H, =CH) ppm | ¹³C-NMR (D₂O, 126 MHz): δ = 31.8 (-CH₂-), 47.2 (NNN-CH₂), 47.5 (N-CH₂), 58.1 (O-CH₂), 125.3 (=CH), 143.2 (=C_q) ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₁₈H₃₁N₁₀O₃]⁺ 435.2581, gef. 435.2574

6-4 | Synthesevorschriften für ein Alkin-modifiziertes *T4 RNA Ligase 1* Substrat

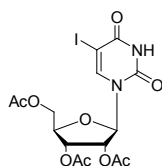
2',3',5'-*O*-Triacetyluridin 65^[155b]



In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde Uridin (4.88 g, 20.0 mmol) in 100 ml wasserfreien 1,4-Dioxan suspendiert und mit 16 ml Ac₂O sowie 16 ml wasserfreiem NEt₃ versetzt. Nach 36 h Rühren bei RT wurde die klare, gelbe Lösung am Rotationsverdampfer eingengt und Verunreinigungen säulenchromatografisch an Kieselgel mit dem Stufengradienten 50→60 % EtOAc in Cyclohexan entfernt.

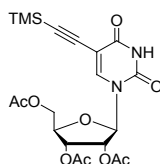
7.38 g (19.5 mmol, 98 %) farbloser Feststoff | $C_{15}H_{18}N_2O_9$ | $R_f = 0.13$, 40 % Cyclohexan in EtOAc | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): $\delta = 2.05$ (s, 3H, CH₃), 2.05 (s, 3H, CH₃), 2.08 (s, 3H, CH₃), 4.19 – 4.27 (m, 2H, H4', H5'), 4.32 (dd, $J = 11.5, 3.0$ Hz, 1H, H5'), 5.29 – 5.33 (m, 1H, H3'), 5.42 – 5.47 (m, 1H, H2'), 5.72 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H5), 5.89 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, H1'), 7.72 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H6), 11.47 (s, 1H, 3NH) ppm | ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 126 MHz): $\delta = 19.9$ (CH₃), 19.9 (CH₃), 20.2 (CH₃), 62.6 (C5'), 69.3 (C3'), 71.4 (C4'), 78.6 (C2'), 87.6 (C1'), 102.1 (C5), 141.2 (C6), 149.9 (C2), 162.6 (C4), 2×169.0 (O=C_q), 169.7 (O=C_q) ppm | ESI-MS m/z ber. für $[C_{15}H_{18}N_2O_9Na]^+$ 393.3, gef. 393.2

2',3',5'-*O*-Triacetyl-5-iodouridin **66**^[155b]



Eine Lösung aus 2',3',5'-*O*-Triacetyluridin **65** (3.30 g, 8.92 mmol) in 140 ml MeCN wurde nach Zugabe von $(NH_4)_2Ce(NO_3)_6$ (2.44 g, 4.45 mmol) und Iod (1.36 g, 5.36 mmol) für 1.5 h auf 80 °C erhitzt und danach im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde in 120 ml EtOAc aufgenommen und die organische Phase mit 120 ml kalter 5%iger $NaHSO_3$ und 100 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die Zugabe von 100 ml CH_2Cl_2 verbesserte dabei die Sichtbarkeit der Phasengrenze. Die wässrigen Phasen wurden mit 5×75 ml CH_2Cl_2 extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer zu einem orangenen Feststoff eingengt. Dieser wurde säulenchromatografisch an Kieselgel mit dem Stufengradienten 30→50→60 % EtOAc in Cyclohexan gereinigt.

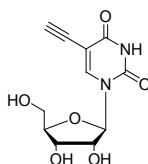
4.29 g (8.65 mmol, 97 %) farbloser Feststoff | $C_{15}H_{17}IN_2O_9$ | $R_f = 0.46$, 60 % EtOAc in Cyclohexan | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): $\delta = 2.05$ (s, 3H, CH₃), 2.07 (s, 3H, CH₃), 2.08 (s, 3H, CH₃), 4.20 – 4.29 (m, 2H, H4', H5'), 4.30 – 4.38 (m, 1H, H5'), 5.31 – 5.37 (m, 1H, H3'), 5.46 (dd, $J = 6.4, 5.1$ Hz, 1H, H2'), 5.87 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H1'), 8.18 (s, 1H, H6), 11.84 (s, 1H, 3NH) ppm | ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 101 MHz): $\delta = 20.7$ (CH₃), 20.8 (CH₃), 21.1 (CH₃), 63.4 (C5'), 69.9 (C3'), 71.0 (C4'), 72.5 (C5), 79.6 (C2'), 88.5 (C1'), 146.0 (C6), 150.5 (C2), 160.9 (C4), 2×169.8 (O=C_q), 170.5 (O=C_q) ppm | ESI-MS m/z ber. für $[C_{15}H_{16}IN_2O_9]^+$ 495.2, gef. 494.9

2',3',5'-O-Triacetyl-5-[(trimethylsilyl)ethynyl]Uridin **67^[156]**

Unter Lichtausschluss und Argon-Schutzgasatmosphäre wurden zu einer Lösung aus **66** (2.83 g, 5.71 mmol) in 17 ml wasserfreiem DMF und wasserfreiem NEt₃ (1.73 g, 2.38 ml, 17.1 mmol) der Reihe nach Trimethylsilylacetylen (1.68 g, 1.17 ml, 17.1 mmol), CuI (0.22 g, 1.14 mmol) und PdCl₂(PPh₃)₂ (0.40 g, 0.57 mmol) zugefügt. Diese Lösung rührte 21 h bei RT und wurde danach im Vakuum bis zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wurde in 200 ml EtOAc aufgenommen und mit 5 × 50 ml H₂O sowie 50 ml ges. NaCl-Lösung gewaschen. Zur Unterstützung der Phasentrennung wurden 20 ml CH₂Cl₂ zugeetzt. Die wässrige Phase wurde anschließend mit 2 × 50 ml CH₂Cl₂ extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über Na₂SO₄ getrocknet und dann am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeeengt. Das Rohprodukt wurde durch säulenchromatografischen Reinigung an Kieselgel mit dem Stufengradienten 30→40→50 % EtOAc in Cyclohexan gereinigt.

2.04 g (4.38 mmol, 77 %) hellbrauner Feststoff | C₂₀H₂₆N₂O₉Si | *R_f* = 0.49, 60 % EtOAc in Cyclohexan | ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 0.22 (s, 9H, Si-CH₃), 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.13 (s, 3H, CH₃), 2.22 (s, 3H, CH₃), 4.35 – 4.41 (m, 3H, H4', 2 × H5'), 5.30 – 5.35 (m, 2H, H2', H3'), 6.11 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, H1'), 7.76 (s, 1H, H6), 8.65 (s, 1H) ppm | ¹³C-NMR (CDCl₃, 126 MHz): δ = 3 × - 0.5 (Si-CH₃), 20.1 (CH₃), 20.2 (CH₃), 20.6 (CH₃), 62.7 (C5'), 69.9 (C3'), 72.9 (C4'), 80.0 (C2'), 86.8 (C1'), 94.5 (≡C_q), 100.0 (≡-Si), 101.2 (C5), 141.7 (C6), 148.7 (C2), 160.1 (C4), 169.2 (O=C_q), 169.3 (O=C_q), 169.7 (O=C_q) ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₂₀H₂₇N₂O₉Si]⁺ 467.1486, gef. 467.1481

131

5-Ethynyluridin **68^[156]**

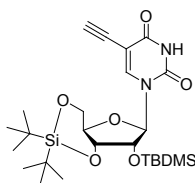
In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde **67** (2.04 g, 4.38 mmol) in 40 ml wasserfreiem MeCN gelöst und mit TBAF × 3H₂O (1.54 g, 4.60 mmol) versetzt. Nach 14 h Rühren wurde die Lösung am Rotationsverdampfer (30 °C) eingeeengt und dann im Feinvakuum getrocknet. Nach Aufnahme des Rückstands in 150 ml CH₂Cl₂ wurde mit je 50 ml H₂O und ges. NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrigen Phasen wurden vereint und mit 3 × 50 ml CH₂Cl₂ reextrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum zu einem braunen Feststoff eingeeengt. Verunreini-

gungen wurden durch Säulenchromatografie an Kieselgel mit dem Laufmittel 1 % MeOH in CH₂Cl₂ entfernt. Die produktenthaltenden Fraktionen lieferten nach Entfernen aller flüchtigen Bestandteile im Vakuum einen farblosen Feststoff (1.73 g, 4.40 mmol), der in 44 ml Pyridin gelöst wurde. Nach Zugabe von 22 ml EtOH wurde auf – 10 °C abgekühlt und 22 ml 1 M NaOH-Lösung addiert. Die Lösung wurde 3 h bei – 10 °C gerührt und danach mit nach Herstellerangaben konditioniertem DOWEX 50W × 8 auf einen pH 6.8 eingestellt. Der Ionenaustauscher wurde durch Filtration separiert und das Filtrat am Rotationsverdampfer zu einem Feststoff eingengt. Die säulenchromatografische Reinigung des Rückstands an Kieselgel erfolgte mit dem Laufmittel 10 % MeOH in CH₂Cl₂.

0.82 g (3.04 mmol, 70 %) hellgelber Feststoff | C₁₁H₁₂N₂O₆ | *R_f* = 0.18, 10 % MeOH in CH₂Cl₂ | ¹H-NMR (DMSO-d₆, 500 MHz): δ = 3.53 – 3.72 (m, 2H, H5'), 3.84 – 3.88 (m, 1H, H4'), 3.98 (t, *J* = 4.8 Hz, 1H, H3'), 4.04 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H, H2'), 5.07 (s, 1H, OH), 5.24 (s, 1H, OH), 5.43 (s, 1H, OH), 5.74 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, H1'), 8.38 (s, 1H, H6), 11.68 (s, 1H, 1H, 3NH) ppm | ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 126 MHz): δ = 60.1 (C5'), 69.2 (C3'), 73.9 (C2'), 76.2 (≡CH), 83.5 (≡C_q), 84.6 (C4'), 88.3 (C1'), 97.5 (C5), 144.6 (C6), 149.6 (C2), 161.5 (C4) ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₁₁H₁₁N₂O₆][–]: 267.0617, gef. 267.0624

2'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3',5'-*O*-bis(*tert*-butyl)silyl-5-ethynyluridin **69**

132

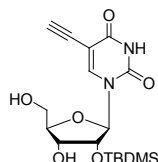


Eine Lösung aus 5-Ethynyluridin **68** (120 mg, 0.45 mmol) in 0.9 ml wasserfreiem DMF wurde auf 0 °C abgekühlt und tropfenweise mit Di-*tert*-butylsilylbis(trifluoromethansulfonat) (217 mg, 0.49 mmol) versetzt. Nach 60 min Rühren bei 0 °C wurde Imidazol (152 mg, 2.25 mmol) zugefügt, das Eisbad 5 min später entfernt und die Lösung weitere 25 min gerührt. Nach Zugabe von *tert*-Butyldimethylsilylchlorid (73.8 mg, 0.49 mmol) wurde das Reaktionsgemisch für 2.5 h auf 60 °C erwärmt und dann weitere 30 min bei RT gerührt. Zur Aufarbeitung wurden 20 ml 0.1 M wässrige HCl-Lösung und 100 ml CH₂Cl₂ zugegeben und die wässrige Phase mit 3 × 100 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 100 ml ges. NaHCO₃-Lösung gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum entfernt. Die säulenchromatografische Reinigung an Kieselgel mit dem Stufengradienten 0→1→2.5 % MeOH in CH₂Cl₂ lieferte das gewünschte Produkt.

162 mg (0.31 mmol, 69 %) farbloser Feststoff | C₂₅H₄₂N₂O₆Si₂ | *R_f* = 0.43, 5 % MeOH in CH₂Cl₂ | ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ = 0.12 (s, 3H, Si-CH₃), 0.17 (s, 3H, Si-CH₃), 0.91 (s, 9H, ^tBuSi-CH₃), 1.01 (s, 9H, ^tBuSi-CH₃), 1.04 (s, 9H, ^tBuSi-CH₃), 3.19 (s, 1H, ≡CH), 3.83 (dd, *J* = 9.7, 4.7 Hz, 1H, H5'), 3.96 – 4.02 (m, 1H, H3'), 4.17 (td, *J* = 10.2, 5.2 Hz, 1H, H4'),

4.27 (d, $J = 4.6$ Hz, 1H, H2'), 4.51 (dd, $J = 9.3, 5.1$ Hz, 1H, H5'), 5.64 (s, 1H, H1'), 7.54 (s, 1H, H6), 9.54 (s, 1H, 3NH) ppm | ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 126 MHz): $\delta = -5.1$ (Si-CH₃), -4.3 (Si-CH₃), 18.1 ($^t\text{BuSi-C}_q$), 20.3 ($^t\text{BuSi-C}_q$), 22.7 ($^t\text{BuSi-C}_q$), 3×25.8 ($^t\text{BuSi-CH}_3$), 3×26.9 ($^t\text{BuSi-CH}_3$), 3×27.4 ($^t\text{BuSi-CH}_3$), 67.5 (C5'), 74.4 ($\equiv\text{CH}$), 74.6 (C2'), 75.3 (C3'), 75.9 (C4'), 82.2 ($\equiv\text{C}_q$), 93.9 (C1'), 99.1 (C5), 142.8 (C6), 148.7 (C2) 161.3 (C4) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[\text{C}_{25}\text{H}_{41}\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}]^-$: 521.2503, gef. 521.2508

2'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-5-ethynyluridin 70

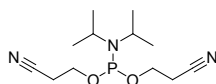


Eine eisgekühlte Lösung von **69** (160 mg, 0.31 mmol) in 1.5 ml wasserfreiem THF wurde vorgelegt und mit einer eisgekühlten Lösung von $\text{HF} \times \text{Pyridin}$ (28.3 μL , 70 % HF) in 400 μL wasserfreiem Pyridin tropfenweise versetzt. Innerhalb der nächsten 40 min wurde die Lösung allmählich auf RT erwärmt und nach Zufügen von 540 μL Pyridin mit 20 ml CH_2Cl_2 und 15 ml H_2O verdünnt. Die wässrige Phase wurde mit 3×30 ml CH_2Cl_2 extrahiert und die vereinigten Extrakte mit 20 ml ges. NaHCO_3 -Lösung gewaschen. Die NaHCO_3 -Phase wurde mit 30 ml CH_2Cl_2 reextrahiert. Anschließend wurden alle vereinigten organischen Phasen über Na_2SO_4 getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Danach wurden alle flüchtigen Bestandteile im Feinvakuum entfernt.

133

130 mg (0.34 mmol, > 99 %) farbloser Feststoff | $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}$ | $R_f = 0.27$, 2 % MeOH in CH_2Cl_2 | ^1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz): $\delta = 0.11$ (s, 3H, Si-CH₃), 0.12 (s, 3H, Si-CH₃), 0.92 (s, 9H, $^t\text{BuSi-CH}_3$), 3.76 (dd, $J = 12.2, 2.4$ Hz, 1H, H5'), 3.90 (dd, $J = 12.2, 2.4$ Hz, 1H, H5'), 4.03 – 4.06 (m, 1H, H3'), 4.12 (t, $J = 5.0$ Hz, 1H, H4'), 4.30 (t, $J = 4.5$ Hz, 1H, H2'), 5.88 (d, $J = 4.2$ Hz, 1H, H1'), 8.53 (s, 1H, H6) ppm | APT (CD_3OD , 126 MHz): $\delta = -5.2$ (Si-CH₃), -5.0 (Si-CH₃), 18.7 ($^t\text{BuSi-C}_q$), 3×25.9 ($^t\text{BuSi-CH}_3$), 61.3 (C5'), 70.7 (C2'), 75.5 ($\equiv\text{CH}$), 77.4 (C3'), 82.5 ($\equiv\text{C}_q$), 86.0 (C4'), 90.5 (C1'), 99.4 (C5), 145.9 (C6), 150.9 (C2), 163.9 (C4) ppm | HPLC-MS m/z ber. für $[\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_6\text{Si}]^+$ 383.5, gef. 383.2

Bis(2-cyanoethyl)-*N,N*-Diisopropylphosphoramidit 63^[152]

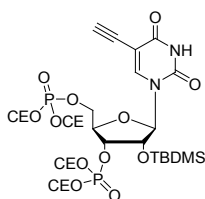


In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde DIPEA (22.0 g, 27.8 ml, 170 mmol) in 40 ml wasserfreiem THF vorgelegt und bei 0 °C nacheinander langsam mit 3-Hydroxypropionitril (8.70 g, 8.20 ml, 122 mmol) und *N,N*-Diisopropylphosphoramiditdichlorid (12.9 g, 63.8 mmol) versetzt. Das Eisbad wurde entfernt und der Reaktionsansatz 1.5 h bei RT gerührt. Mittels einer Umkehrfritte wurde der Niederschlag unter Argongas separiert

und das Filtrat am Rotationsverdampfer (< 35 °C, 120 mbar) auf ein minimales Volumen eingengt. Die Reinigung des orangenen Öls erfolgte säulenchromatografisch unter Argongasdruck an Kieselgel (Ø 3.5 cm × 30 cm, mit 5 % NEt₃ in Cyclohexan vorbehandelt) mit 1 l des Laufmittelgemisches 5 % NEt₃, 15 % EtOAc in Cyclohexan. Es wurden drei Fraktionen mit je 300 ml Eluent aufgefangen, die am Rotationsverdampfer eingengt und unter Argongas aufbewahrt wurden. Alle drei Fraktionen waren gemäß ¹H- und ¹³C-NMR-Analyse identisch und wurden vereinigt.

10.2 g (37.4 mmol, 59 %) farbloses Öl | C₁₂H₂₂N₃O₂P | ¹H-NMR (CDCl₃, wasserfrei, 400 MHz): δ = 1.18 (d, *J* = 6.8 Hz, 12H, CH₃), 2.65 (t, *J* = 6.3 Hz, 4H, CH₂), 3.56 – 3.67 (m, 2H, CH), 3.76 – 3.94 (m, 4H, O-CH₂) ppm | APT (CDCl₃, wasserfrei, 101 MHz)*: δ = 20.6 (d, *J* = 6.8 Hz, CH₂), 24.8 (d, *J* = 7.4 Hz, CH₃), 43.4 (d, *J* = 12.5 Hz, CH), 58.6 (d, *J* = 18.8 Hz, O-CH₂), 117.8 (br s, CN) ppm | ³¹P-NMR (CDCl₃, wasserfrei, 162 MHz): δ = 149.0 ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₁₂H₂₃N₃O₂P]⁺ 272.1528, gef. 272.1526

2'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3',5'-*O*,*O*-bis[di(2-cyanoethyl)]phosphoryl-5-ethinyl-uridin **71**



134

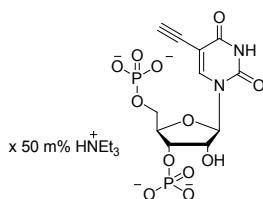
In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde eine eisgekühlte Suspension von **70** (90.8 mg, 0.24 mmol) in 0.6 ml wasserfreiem CH₂Cl₂ vorgelegt und tropfenweise mit Phosphoramidit **63** (193 mg, 0.71 mmol) versetzt. Nach Zugabe von 1*H*-Tetrazol (1.59 ml, 0.71 mmol, 0.45 M in MeCN) wurde die Lösung für 2 h bei 0 °C gerührt und dann *tert*-Butylhydroperoxid (0.26 ml, 1.43 mmol, 5-6 M in Decan) zugegeben. Nach 10 min wurde das Eisbad entfernt, die Reaktion 45 min bei RT fortgesetzt und das Reaktionsgemisch anschließend erst am Rotationsverdampfer (35 °C) eingengt und dann über Nacht im Feinvakuum getrocknet. Verunreinigungen wurden durch Säulenchromatografie an Kieselgel mit dem Stufengradienten 1→2.5→3.5→5 % MeOH in CH₂Cl₂ entfernt.

124 mg (0.17 mmol, 69 %) farbloser Feststoff | C₂₉H₄₀N₆O₁₂P₂Si | *R_f* = 0.42, 5 % MeOH in CH₂Cl₂ | ¹H-NMR (CD₃CN, 500 MHz): δ = 0.11 (s, 3H, Si-CH₃), 0.13 (s, 3H, Si-CH₃), 0.89 (s, 9H, *t*BuSi-CH₃), 2.82 – 2.86 (m, 8H, CH₂), 3.47 (s, 1H, ≡CH), 4.26 – 4.32 (m, 8H, O-CH₂), 4.38 – 4.43 (m, 1H, H5'), 4.43 – 4.50 (m, 3H, H3', H4', H5'), 4.80 (dt, *J* = 8.2, 5.0 Hz, 1H, H2'), 5.79 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H, H1'), 7.90 (s, 1H, H6), 8.95 (s, 1H, 3NH) ppm | ¹³C-NMR (CD₃CN, 126 MHz): δ = -4.8 (Si-CH₃), -4.7 (Si-CH₃), 18.6 (*t*BuSi-C_q), 2 × 20.2 (d, *J* = 3.8 Hz,

* Diastereomere

CH₂), 2 × 20.3 (d, *J* = 3.8 Hz, CH₂), 3 × 25.9 (*t*BuSi-CH₃), 2 × 63.9 (d, *J* = 4.3 Hz, O-CH₂), 64.1 (d, *J* = 4.3 Hz, O-CH₂), 64.2 (d, *J* = 4.3 Hz, O-CH₂), 66.8 (d, *J* = 4.9 Hz, C5'), 74.7 (d, *J* = 4.9 Hz, C3'), 75.2 (d, *J* = 4.9 Hz, C2'), 76.0 (≡CH), 81.3 (dd, *J* = 8.2, 4.1 Hz, C4'), 83.1 (≡C_q), 90.3 (C1'), 99.7 (C5), 2 × 118.4 (CN), 2 × 118.4 (CN), 144.6 (C6), 150.3 (C2), 162.2 (C4) ppm | ³¹P-NMR (CD₃CN, 162 MHz): δ = -0.9, -1.2 ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₂₉H₄₀N₆O₁₂P₂SiNa]⁺ 777.1846, gef. 777.1835

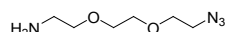
3',5'-*O,O*-Bisphosphat-5-ethinyluridin **72** pUp^{Alk}



Die Substanz **71** (101 mg, 0.13 mmol) wurde mit 2 × 5 ml wasserfreiem Pyridin koevaporiert, in 13 ml wasserfreiem Pyridin gelöst und mit 1.25 ml BSA sowie 120 µl DBU versetzt. Die Lösung rührte für 5.5 h, dann wurden 50 ml H₂O und Et₂O (1:1, v/v) zugefügt und die organische Phase mit 2 × 10 ml H₂O extrahiert. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden erst mit 3 × 5 ml Toluol, dann mit 2 × 5 ml Pyridin koevaporiert und anschließend im Feinvakuum getrocknet. Das braune Öl wurde bei RT und unter Schlenkbedingungen in 1 ml NEt₃ × 3HF aufgenommen und für 20 h bei RT gerührt. Unter heftiger Schaumbildung wurden 8 ml TEAB-Puffer (0.5 M, pH 7.5) zugetropft und die Lösung nach 45 min Rühren bei RT am Rotationsverdampfer (< 35 °C) eingeeengt. Das Rohprodukt wurde in TEAB-Puffer (0.3 M, pH 7.5) gelöst und säulenchromatografisch mit DEAE-Sephadex® (Ø 1.5 cm × 12 cm, konditioniert und äquilibriert in 0.3 M TEAB-Puffer, pH 7.5) und dem Stufengradienten 0.3→0.4→0.5→0.6→0.7→0.8→1.0 M TEAB-Puffer (pH 7.5) gereinigt. Das Einengen der produktenthaltenden Fraktionen erfolgte abschließend am Rotationsverdampfer (< 35 °C), zusätzlich wurde mit EtOH koevaporiert. Zusätzlich wurde lyophilisiert. NEt₃-Reste konnten nicht vollständig entfernt werden, und wurden bei der Berechnung der Ausbeute berücksichtigt.

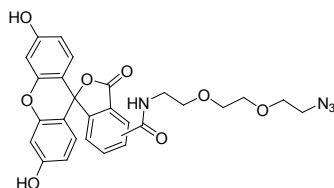
135

101 mg (0.11 mmol mit 49 m% NH₄Et₃⁺, 85 %) farbloser Feststoff | C₁₁H₁₄N₂O₁₂P₂ | *R_f* = 0.5, 60 % *i*PrOH in H₂O mit 0.1 % 1 M wässrige HCl-Lösung | ¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): δ = 1.27 (t, *J* = 7.3 Hz, 29H, NH₄Et₃⁺), 3.20 (q, *J* = 7.3 Hz, 15H, NH₄Et₃⁺), 3.60 (s, 1H, ≡CH), 4.09 – 4.21 (m, 2H, H5'), 4.45 (d, *J* = 4.7 Hz, 2H, H3', H4'), 4.62 – 4.68 (m, 1H, H2'), 6.00 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H, H1'), 8.24 (s, 1H, H6) ppm | ¹³C-NMR (D₂O, 126 MHz): δ = 8.2 (NH₄Et₃⁺), 46.6 (NH₄Et₃⁺), 63.8 (d, *J* = 4.2 Hz, C2'), 72.3 (d, *J* = 3.8 Hz, C5'), 73.5 (d, *J* = 2.6 Hz, C3'), 74.3 (≡CH), 83.0 (dd, *J* = 8.0, 5.9 Hz, C4'), 83.5 (≡C_q), 88.8 (C1'), 99.0 (C5), 145.4 (C6), 150.7 (C2), 164.6 (C4) ppm | ³¹P-NMR (D₂O, 202 MHz): δ = 0.6, 1.0 ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₁₁H₁₃N₂O₁₂P₂]⁻ 426.9944, gef. 426.9948

2-(2-Aminoethoxy)ethoxyethanazid 74^[178]

In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde 1,2-Bis(2-chloroethoxyethan) (3.00 g, 2.51 ml, 16.0 mmol) mit 75 ml wasserfreiem DMF verdünnt und nacheinander mit einer Spatelspitze Dicyclohexyl-18-krone-6 und NaN₃ (3.42 g, 52.7 mmol) versetzt. Die Lösung wurde für 48 h auf 60 °C erwärmt, mit 200 ml H₂O verdünnt und mit 5 × 50 ml Et₂O extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösemittel im Vakuum vorsichtig (40 °C, max. 200 mbar) entfernt. Das Rohöl wurde mit 250 ml Et₂O verdünnt, mit 2 × 25 ml H₂O gewaschen und nach Trocknen über Na₂SO₄ behutsam eingengt. Aufgrund der Flüchtigkeit des Zwischenproduktes (4.00 g, ~15.6 mmol) konnte das DMF nicht vollständig entfernt werden. Unter Annahme eines quantitativen Stoffumsatzes wurde das Zwischenprodukt in einem Lösemittelgemisch aus 45 ml Et₂O, THF und 1 M wässriger HCl-Lösung (1:1:0.1, v/v/v) aufgenommen und bei RT unter kräftigem Rühren tropfenweise mit einer Lösung von Triphenylphosphin (4.06, 15.5 mmol) in 23 ml Et₂O versetzt. Nach 7 h Rühren bei RT wurde der Ansatz auf 50 ml Et₂O gegossen und mit 3 × 100 ml 1 M wässriger HCl-Lösung extrahiert. Hiernach wurde die wässrige Phase mit NaOH-Pellets auf einen pH-Wert 14 eingestellt und mit 5 × 50 ml CH₂Cl₂ extrahiert. Eine DC-Kontrolle belegte die vollständige Überführung des Produktes in die organische Phase, die abschließend über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingengt wurde (40 °C, max. 700 mbar). Zur Abtrennung des Phosphinoxids wurde die Synthese mit einer säulenchromatografischen Trennung an Kieselgel mit dem Stufengradienten 0→10 % MeOH in CH₂Cl₂ abgeschlossen.

2.36 g (13.5 mmol, 84 %) farbloses Öl | C₆H₁₄N₄O₂ | *R_f* = 0.25, 10 % MeOH in CH₂Cl₂ | ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 2.41 (s, 2H, 2NH), 2.91 (d, *J* = 4.3 Hz, 2H, NH₂-CH₂), 3.36 – 3.42 (m, 2H, N₃-CH₂), 3.52 – 3.58 (m, 2H, O-CH₂), 3.60 – 3.70 (m, 6H, O-CH₂) ppm | ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 41.4 (NH₂-CH₂), 50.7 (N₃-CH₂), 70.0 (O-CH₂), 70.3 (O-CH₂), 70.6 (O-CH₂), 72.4 (O-CH₂) ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₆H₁₅N₄O₂]⁺ 175.1195, gef. 175.1187

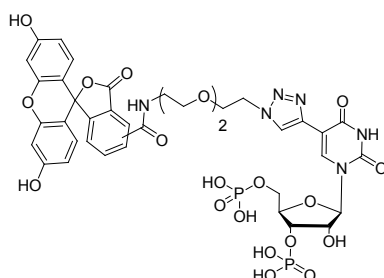
***N*-([2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethanazid)-5/6-Fluoresceinamid 75 (FAM-N₃)**

Unter Ausschluss von Licht wurde 5/6-Carboxyfluorescein (0.63 g, 1.68 mmol) in einer Argon-Schutzgasatmosphäre in 10 ml eines Gemisches aus wasserfreiem THF und DMF (2:1, v/v) gelöst. Dazu wurden nacheinander *N*-Hydroxysuccinimid (0.23 g, 2.02 mmol)

und *N,N'*-Diisopropylcarbodiimid (0.25 g, 0.31 ml, 2.02 mmol) gegeben. Nach 24 h Rühren bei RT wurde **74** (0.20 g, 1.12 mmol), verdünnt in 12.5 ml DMF-Boratpuffer (1:1, v/v, pH 8.5), zugetropft und die Lösung weitere 24 h bei RT gerührt. Die Reinigung des Rohproduktes benötigte zwei säulenchromatografische Trennungen: Zuerst an Kieselgel mit dem Stufengradienten 4→7→10 % MeOH in CH₂Cl₂ und abschließend mit RP₁₈-modifiziertem Kieselgel und dem Stufengradienten 5→10→15→20→30 % MeOH in CH₂Cl₂.

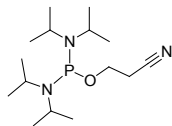
253 mg (0.47 mmol, 42 %) orangener Feststoff | C₂₇H₂₄N₄O₈ | *R_f* = 0.36, 15 % MeOH in CH₂Cl₂ | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₂₇H₂₃N₄O₈]⁻: 531.1516, gef. 531.1521 | HPLC/UV/MS *t_R* = 12.8 und 13.0, Gradient 3→90 % B in A in 20 min

FAM-markiertes 3',5'-*O,O*-Bisphosphatluridin pUp^{FAM} **76**



3',5'-*O,O*-Bisphosphat-5-ethinyluridin **pUp^{Alk}** (30 mg mit 43 m% NH₄Et₃⁺, 0.04 mmol) wurde in 0.5 ml H₂O gelöst, mit **75** (103 µl, 82.4 µmol, 0.8 M in DMSO) versetzt und mit 6 ml, einer Lösung aus DMSO und H₂O (1:1, v/v) verdünnt. Nach Erwärmen der Lösung auf 40 °C wurde THPTA (208 mg, 0.48 mmol) zugegeben und die Lösung über eine Eppendorf-Spitze mit Argongas 30 sek entgast. Dann wurden NaAsc (181 mg, 0.96 mmol) und CuSO₄ × 5H₂O (76.6 mg, 0.30 mmol) addiert und die Reaktionslösung 2 d gerührt. Anschließend wurde die Lösung, trotz unvollständigen Eduktumsatz, im Vakuum eingengt und an RP₁₈-modifiziertem Kieselgel (Ø 1 cm × 3 cm, mit 6 ml MeCN konditioniert, mit 3 × 6 ml 0.1 % 1 M wässrige HCl-Lösung, 0.1 % MeCN in H₂O äquilibriert), mit dem Stufengradienten 0.1→3→5→7.5 % MeCN in H₂O mit 0.1 % 1 M wässriger HCl-Lösung gereinigt.

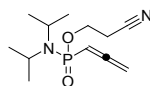
Ausbeute: ~ 5 mg (5.1 µmol, 13 %) gelber Feststoff | C₃₈H₃₈N₆O₂₀P₂ | *R_f* = 0.90, 0.1 % 1 M wässrige HCl-Lösung, 70 % *i*PrOH in H₂O | ³¹P-NMR (DMSO-*d*₆, 121 MHz): δ = 0.1, 0.2 ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₃₈H₃₇N₆O₂₀P₂]⁻ 959.1538, gef. 959.1549 | HPLC/UV/MS 13.92 und 14.90 min, Gradient 0→50 % B in A in 20 min

6-5 | Synthesevorschriften für einen Alkin-modifizierten *in-vitro*-Transkriptionsstarter**2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-Tetraisopropylphosphoramidit 77^[179]**

In einem ausgeheizten Schlenkkolben wurde DIPEA (60.7 g, 84.3 ml, 600 mmol) mit 125 ml wasserfreiem MeCN verdünnt und auf – 10 °C abgekühlt. Unter kräftigem Rühren wurde PCl₃ (13.7 g, 8.75 ml, 100 mmol) über 30 min zugetropft und die Reaktionslösung bei RT weitere 45 min gerührt. Die milchige Suspension wurde mit 125 ml wasserfreiem Cyclohexan verdünnt, erneut auf – 10 °C gekühlt und über einen Zeitraum von 15 min mit 3-Hydroxypropionitril (8.70 g, 8.20 ml, 122 mmol) versetzt. Nach 1 h Rühren bei RT wurde der Niederschlag über eine Umkehrfritte abfiltriert und mit 30 ml wasserfreiem Cyclohexan gewaschen. Nach 30 min Stehenlassen bei RT wurde die obere Cyclohexan-Phase mittels einer Kanüle abgetrennt und am Rotationsverdampfer (30 °C, 170 mbar) eingeeengt. Die MeCN-Phase wurde mit wasserfreiem Cyclohexan extrahiert (150 ml), das Extrakt analog separiert und eingeeengt. Die vereinigten Cyclohexanphasen wurden mit Hilfe einer Kugelrohrdestillation (67 °C, 1.3 mbar) gereinigt.

138

15.3 g (50.8 mmol, 51 %) hellgelbes Öl | C₁₅H₃₂N₃OP | ¹H-NMR (CDCl₃, wasserfrei, 300 MHz): δ = 1.17 (dd, *J* = 6.7, 5.0 Hz, 24H, CH₃), 2.61 (td, *J* = 6.4, 0.9 Hz, 2H, CH₂), 3.45 – 3.60 (m, 4H, CH), 3.76 (dt, *J* = 7.3, 6.4 Hz, 2H, O-CH₂) ppm | APT (CDCl₃, wasserfrei, 75 MHz): δ = 20.5 (d, *J* = 8.9 Hz, CH₂), 4 × 23.8 (d, *J* = 8.2 Hz, CH₃), 4 × 24.6 (d, *J* = 5.7 Hz, CH₃), 4 × 44.6 (d, *J* = 12.4 Hz, CH), 59.2 (d, *J* = 24.9 Hz, O-CH₂), 116.7 (br s, CN) | ³¹P-NMR (CDCl₃, wasserfrei, 121 MHz): δ = 124.1 ppm

Allenylisches Phosphonat 79

Variante 1: Bei RT wurde unter Schlenkbedingungen zu einer Lösung aus Propargylalkohol (0.50 g, 8.91 mmol) in 250 ml wasserfreiem CH₂Cl₂ langsam 2-Cyanoethyl-*N,N,N',N'*-Tetraisopropylphosphoramidit (2.68 g, 8.91 mmol) und danach 1*H*-Tetrazol (19.8 ml, 8.91 mmol, 0.45 M in MeCN) zugetropft. Nach 5 h Rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von ges. NaHCO₃-Lösung gestoppt, die organische Phase separiert, über Na₂SO₄ getrocknet und im Vakuum aufkonzentriert.

Variante 2: Unter einer Argongasatmosphäre wurde *N,N*-Diisopropylphosphoramiditdichlorid (9.42 g, 46.6 mmol) mit 30 ml wasserfreiem THF verdünnt. Die Lösung wurde

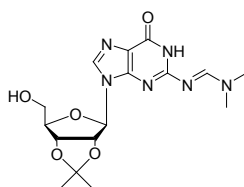
auf 0 °C gekühlt und mit DIPEA (18.1 g, 23.8 ml, 140 mmol) versetzt. Nach 20 min Rühren bei 0 °C wurde erst Propargylalkohol (2.74 g, 2.82 ml 48.9 mmol) und dann 3-Hydroxypropionitril (3.31 g, 3.12 ml, 46.6 mmol) zugetropft. Nach weiteren 20 min Rühren bei 0 °C wurde das Eisbad entfernt und die Lösung innerhalb von 60 min auf RT erwärmt. Mittels Umkehrfritte wurde der gebildete Niederschlag entfernt und das Filtrat am Rotationsverdampfer (30 °C, 120 mbar) eingeeengt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatografisch an Kieselgel (Ø 3.5 cm × 25 cm) mit 1 l des Laufmittelgemischs 5 % NEt₃, 15 % EtOAc in Cyclohexan unter Argongasdruck gereinigt und alle Fraktionen im Vakuum eingeeengt.

Variante 1: 1.33 g (7.15 mmol, 80 %) gelbes Öl | C₁₂H₂₁N₂O₂P | ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ = 1.25 (dd, *J* = 10.9, 6.8 Hz, 12H, CH₃), 2.75 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH₂), 3.33 – 3.56 (m, 2H, CH), 4.00 – 4.29 (m, 2H, O-CH₂), 4.96 (ddd, *J* = 13.2, 6.9, 1.9 Hz, 2H, =CH₂), 5.35 (td, *J* = 6.9, 1.5 Hz, 1H, =CH) ppm | ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz): δ = 19.6 (d, *J* = 7.0 Hz, CH₂), 2 × 21.8 (br, CH₃), 2 × 23.0 (br, CH₃), 45.6 (d, *J* = 5.0 Hz, CH), 58.2 (d, *J* = 5.4 Hz, O-CH₂), 75.3 (d, *J* = 15.0 Hz, =CH₂), 82.4 (d, *J* = 180.4 Hz, =CH), 116.7 (br s, CN), 213.1 (br s, C_q) ppm | ³¹P-NMR (CDCl₃, 121 MHz): δ = 20.4 ppm | ESI-HRMS *m/z* ber. für [C₂₄H₄₂N₄O₄P₂Na]⁺ 535.2579, gef. 535.2574 | EA ber. N 10.93 C 56.24 H 8.26 P 12.09, gef. N 10.97 C 56.14 H 8.61 P 11.75

Variante 2: ¹H-, ¹³C- und ³¹P-NMR-Daten stimmen überein mit dem Produkt aus Variante 1

139

2-*N,N*-Dimethylaminomethylen-2',3'-*O,O*-isopropylidenguanosin 82^[180]

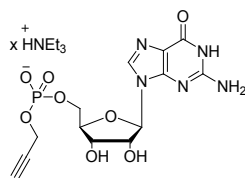


Eine Suspension aus Guanosinhydrat (5.00 g, 17.6 mmol) in 300 ml Aceton wurde bei RT tropfenweise mit 2.35 ml 60%iger HClO₄ versetzt und 2 h gerührt. Unter Eisbadkühlung wurden 3.35 ml konz. NH₄OH addiert und die daraus entstehende gallertartige Masse für 10 min bei 0 °C gerührt. Der farblose Feststoff wurde durch Zentrifugierung und Dekantieren isoliert, mit Aceton gewaschen und im Feinvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 200 ml CHCl₃ und H₂O (1:1, v/v) aufgenommen, mit 3 × 50 ml CHCl₃ extrahiert, über Na₂SO₄ getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Der farblose Feststoff (6.40 g, 16.0 mmol, 91 %) wurde in 50 ml DMF gelöst und bei RT mit *N,N*-Dimethylformamid dimethylacetal (6.29 g, 7.07 ml, 52.8 mmol) versetzt. Nach 24 h Rühren bei RT wurde die Lösung mit 300 ml eines Gemisches aus CHCl₃ und H₂O (1:1, v/v) verdünnt und mit 3 × 50 ml CHCl₃ extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet, auf ein minimales Volumen eingeeengt und über Nacht bei 4 °C gela-

gert. Der dabei abgesetzte farblose Niederschlag wurde durch Zentrifugierung und Dekantieren vom gelben Überstand abgetrennt und abschließend im Feinvakuum getrocknet. Eine säulenchromatografische Reinigung war nicht nötig.

3.47 g (9.18 mmol, 57 %) farbloser Feststoff | $C_{16}H_{22}O_5N_6$ | $R_f = 0.32$, 5 % MeOH in CH_2Cl_2 | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): $\delta = 1.33$ (s, 3H, CH_3), 1.54 (s, 3H, CH_3), 3.04 (s, 3H, N- CH_3), 3.16 (s, 3H, N- CH_3), 3.49 – 3.57 (m, 2H, $H5'$), 4.14 (td, $J = 4.9, 3.0$ Hz, 1H, $H4'$), 4.96 (dd, $J = 6.2, 2.9$ Hz, 1H, $H3'$), 5.04 – 5.12 (m, 1H, $5'OH$), 5.27 (dd, $J = 6.2, 2.9$ Hz, 1H, $H2'$), 6.04 (d, $J = 2.9$ Hz, 1H, $H1'$), 8.02 (s, 1H, H8), 8.57 (s, 1H, =CH), 11.39 (s, 1H, 1NH) ppm | ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 126 MHz): $\delta = 25.2$ (CH_3), 27.0 (CH_3), 34.6 (N- CH_3), 40.7 (N- CH_3), 61.3 ($C5'$), 81.0 ($C3'$), 83.4 ($C2'$), 86.2 ($C4'$), 88.4 ($C1'$), 113.0 (O,O- C_q), 119.7 (C5), 136.1 (C8), 149.4 (C4), 157.3 (C2/6), 157.5 (C2/6), 158.2 (=CH) ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{16}H_{23}O_5N_6]^+$ 379.1730, gef. 379.1726

***O*-(5'-Guanosin)-*O*-propargylmonophosphat 84 (GMP^{Prg})**



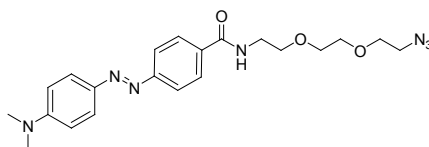
- 140 2-*N,N*-Dimethylaminomethylen-2',3'-*O,O*-isopropylidenguanosin **82** (760 mg, 2.01 mmol) wurde in 5 ml wasserfreiem CH_2Cl_2 suspendiert und mit dem Phosphoramidit **77** (757 mg, 2.51 mmol) versetzt. Bei 0 °C Eisbadkühlung wurde 1*H*-Tetrazol (5.58 ml, 2.51 mmol, 0.45 M in MeCN) zugetropft und die Reaktionslösung auf RT erwärmt. Nach 1 h wurde die Lösung auf 0 °C abgekühlt und nacheinander 3-(Trimethylsilyl)propargylalkohol (513 mg, 4.02 mmol) und 1*H*-Tetrazol (5.58 ml, 2.51 mmol, 0.45 M in MeCN) zugetropft. Die Reaktionslösung wurde nach 1 h Rühren bei RT wieder auf 0 °C gekühlt, mit *tert*-Butylhydroperoxid (1.10 ml, 6.03 mmol, 5 - 6 M in Decan) versetzt und innerhalb von 25 min auf RT erwärmt. Nach Verdünnen mit 50 ml $CHCl_3$, Waschen mit je 20 ml 0.3%iger $NaHSO_3$, ges. NaCl-Lösung sowie H_2O wurde die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Reinigung des gelben Öls erfolgte säulenchromatografisch an Kieselgel mit dem Stufengradienten 0→1.5→3 % MeOH in CH_2Cl_2 und lieferte 706 mg (1.14 mmol, 57 %) eines farblosen Feststoffs ($R_f = 0.24$, 5 % MeOH in CH_2Cl_2). Dieser wurde in 10 ml 7 N NH_3 in MeOH gelöst, ohne Druckausgleich für 2 h auf 50 °C erwärmt, weitere 20 h bei RT gerührt, anschließend am Rotationsverdampfer eingeeengt und über Nacht im Feinvakuum getrocknet. Der farblose Feststoff wurde mit 2 × 10 ml EtOAc gewaschen und erneut über Nacht im Feinvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 1.5 ml H_2O suspendiert und unter Eisbadkühlung mit 1.5 ml TFA versetzt. Die Lösung wurde auf RT erwärmt, nach 5 h Rühren am Rotationsverdampfer ($T < 35$ °C) eingeeengt und im Feinvakuum über Nacht getrocknet. Das Rohprodukt wurde säulenchromatografisch an DEAE-Cellulose

(Ø 1.5 cm × 7 cm, konditioniert und äquilibriert in 0.1 M TEAB-Puffer, pH 7.7) mit dem Stufengradienten 0.1→0.2 M TEAB-Puffer, pH 7.7 gereinigt und die produktenthaltenden Fraktionen in zwei Portionen am Rotationsverdampfer (< 35 °C) aufkonzentriert. Zu diesem Konzentrat wurden 10 ml MeOH zugegeben und diese Lösung für 10 min mit einem Argongasstrom entgast. Zudem wurde mehrfach lyophilisiert. Trotz dieser Maßnahmen gelang es nicht, NEt₃-Reste aus beiden gesammelten Fraktionen vollständig zu entfernen. Dies wurde bei der Ausbeuteberechnung berücksichtigt.

556 mg (0.32 mmol mit 77m% NEt₃, 16 %) + 148 mg (0.28 mmol, 25m% NEt₃, 14 %) hellgelbe Feststoffe | C₁₃H₁₆N₅O₈P | R_f = 0.71, 15 % H₂O in ⁱPrOH | ¹H-NMR (D₂O, 500 MHz): δ = 1.19 (t, J = 7.4 Hz, 119H, NEt₃), 2.83 (t, J = 2.4 Hz, 1H, ≡CH), 3.11 (q, J = 7.3 Hz, 79H, NEt₃), 4.01 – 4.11 (m, 2H, H5'), 4.25 (dt, J = 5.3, 2.8 Hz 1H, H4'), 4.37 (dd, J = 9.4, 2.4 Hz, 2H, O-CH₂), 4.39 – 4.42 (t, J = 4.8 Hz, 1H, H3'), 4.79 (m, 1H, H2'), 5.85 (d, J = 5.2 Hz, 1H, H1'), 8.26 (s, 1H, H8) ppm | ¹³C-NMR (D₂O, 126 MHz):^[162a] δ = 8.2 (NEt₃), 46.7 (NEt₃), 53.5 (d, J = 3.3 Hz, O-CH₂), 65.0 (d, J = 4.9 Hz, C5'), 70.4 (br, C3'), 73.6 (br, C2'), 75.6 (br, ≡CH), 79.1 (d, J = 7.6 Hz, ≡C_q), 83.6 (dd, J = 8.1, 2.1 Hz, C4'), 87.1 (C1'), 116.2 (C5), 137.4 (C8), 151.6 (C4), 153.8 (C2/6), 158.7 (C2/6) ppm | ³¹P (D₂O, 202 MHz) δ = 0.5 ppm | ESI-HRMS m/z ber. für [C₁₃H₁₅N₅O₈P]⁻ 400.0658, gef. 400.0662

N-([2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethanazid)-4-(4-dimethylaminophenylazo)benzamid 85

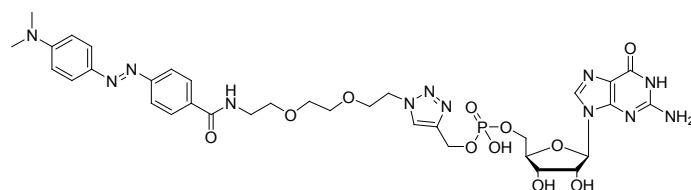
141



In einem Kolben wurde 4-(4-Dimethylaminophenylazo)benzoesäure (1.40 g, 5.20 mmol) in 25 ml DMF vorgelegt und nacheinander HOBt × H₂O (0.89 g, 5.78 mmol), EDC × HCl (1.25 g, 6.52 mmol) sowie DIPEA (2.64 g, 3.56 ml, 20.4 mmol) zugefügt. Nach Kühlung auf 0 °C wurde **74** (1.14 g, 6.54 mmol) tropfenweise addiert und die Lösung unter Lichtausschluss 3 d bei RT gerührt. Anschließend wurde die Lösung am Rotationsverdampfer eingengt und Verunreinigungen mit R_f > 0.30 (20 % Cyclohexan in EtOAc) säulenchromatografisch an Kieselgel mit einem Stufengradienten 50→100 % EtOAc in Cyclohexan abgetrennt. Die produktenthaltenden Fraktionen wurden im Vakuum aufkonzentriert, mit 40 ml einer Lösung aus Cyclohexan und EtOAc (1:3, v/v) verdünnt, 10 min auf 40 °C erwärmt und danach 2 h bei 4 °C stehen gelassen. Dabei fiel aus der roten Lösung ein roter Feststoff (4-(4-Dimethylaminophenylazo)-benzoesäure) aus, der durch Zentrifugierung und Dekantieren vom gewünschten Produkt abgetrennt wurde. Der Überstand wurde am Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingengt, mit Ethanol koevaporiert und über Nacht im Feinvakuum getrocknet.

1.32 g (3.11 mmol, 60 %) dunkelroter Feststoff | $C_{21}H_{27}N_7O_3$ | $R_f = 0.66$, 80 % EtOAc in Cyclohexan | 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz): $\delta = 3.06$ (s, 6H, CH_3), 3.31 – 3.68* (m, 12H, CH_2), 6.83 (d, $J = 9.3$ Hz, 2H, Ar-CH), 7.81 – 7.83 (m, 4H, Ar-CH), 7.98-8.00 (m 2H, Ar-CH) ppm | ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 126 MHz): $\delta = 39.2$ (N- CH_2), * 2 \times 39.6 (N- CH_3), * 49.8 (N₃- CH_2), 68.7 (CH_2), 69.0 (CH_2), 2 \times 69.4 (CH_2), 2 \times 111.3 (Ar-CH), 2 \times 121.3 (Ar-CH), 2 \times 124.9 (Ar-CH), 2 \times 128.1 (Ar-CH), 134.4 (Ar- C_q), 142.4 (Ar- C_q), 152.6 (Ar- C_q), 153.8 (Ar- C_q), 165.7 (O= C_q) ppm | EI-HRMS m/z ber. für $[C_{21}H_{27}N_7O_3]^+$ 425.2175, gef. 425.2175

DAB-markiertes Guanosinmonophosphat 86 (GMP^{DAB})



O-(5'-Guanosin)-*O*-propargylmonophosphat \times 3.5NEt₃ **GMP^{Prg}** (28.1 mg, 37.1 μ mol) wurde in 250 μ l H₂O gelöst und mit **85** (85.0 μ mol, 250 μ l, 0.34 M in DMSO) versetzt. Nach Verdünnung mit 8 ml eines Gemisches aus H₂O und DMSO (1:1, v/v) wurde THPTA (304 mg, 0.70 mmol) addiert und die Reaktionslösung über eine Eppendorfspitze 30 sek mit Argongas entgast. Nach Zugabe von NaAsc (263 mg, 1.40 mmol) und CuSO₄ \times 5 H₂O (112 mg, 0.70 mmol) wurde die Lösung auf 35 °C erwärmt, für 3 d gerührt und das Rohprodukt an RP₁₈-modifiziertem Kieselgel (\varnothing 2 cm \times 3 cm, mit 6 ml MeCN konditioniert, mit 3 \times 6 ml H₂O äquilibriert) mit dem Stufengradienten 5 \rightarrow 10 \rightarrow 15 \rightarrow 20 \rightarrow 25 \rightarrow 30 % MeCN in H₂O säulenchromatografisch gereinigt.

5.80 mg (7.02 μ mol, 19 %) roter Feststoff | $C_{34}H_{43}N_{12}O_{11}P$ | $R_f = 0.79$, 20 % H₂O in *i*PrOH | 1H -NMR (CD₃CN, 500 MHz): $\delta = 3.02$ (s, 6H, N- CH_3), 3.44 – 3.48 (m, 6H, CH_2), 3.51 (s, 4H, CH_2), 3.55 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H, CH_2), 3.79 (t, $J = 5.2$ Hz, 2H, NNN- CH_2), 3.88 – 3.93 (m, 2H, H5'), 4.07 – 4.11 (m, 1H, H4'), 4.17 – 4.18 (m, 1H, H3'), ~ 4.23 – 4.25 (m, 1H, H2'), * 4.78 (d, $J = 7.1$ Hz, 2H, O- CH_2), 5.72 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, H1'), 6.80 (d, $J = 9.2$ Hz, 2H, Ar-CH), 7.71 – 7.75 (m, 2H, Ar-CH), 7.76 – 7.79 (m, 2H, Ar-CH), 7.82 – 7.87 (m, 4H, Ar-CH, =CH, H8) ppm | ^{13}C -NMR (CD₃CN, 126 MHz): $\delta = 33.1$ (N- CH_2), 40.5 (N- CH_3), 40.6 (N- CH_3), 48.2 (NNN- CH_2), 50.9 (CH_2), 2 \times 59.0 (CH_2), 65.6 (d, $J = 4.8$ Hz, C5') 69.7 (CH_2), 69.9 (br, O- CH_2), 70.5 (C2'), 70.7 (C3'), 71.2 (CH_2), 74.7 (C4'), 88.2 (C1'), 112.8 (Ar-CH), 122.8 (Ar-CH), 125.9 (Ar-CH), 125.9 (d, $J = 14.1$ Hz, =CH), 129.4 (Ar-CH), 134.7 (d, $J = 2.8$ Hz, = C_q), 135.1 (Ar- C_q), 143.8 (Ar- C_q), 154.5 (Ar- C_q), 155.7 (Ar- C_q), 169.6 (O= C_q) ppm | ^{31}P (CD₃CN, 202 MHz) $\delta = -2.7$ ppm | ESI-HRMS m/z ber. für $[C_{34}H_{42}N_{12}O_{11}P]^-$ 825.2834, gef. 825.2853 | HPLC/UV/MS $t_R = 12.25$ min, Gradient 3 \rightarrow 90 % B in A in 20 min

* Das Signal liegt unter dem Wasser- bzw. DMSO-Signal

6-6 | Molekularbiologischer Teil

6-6.1 | Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Bei direkten Arbeiten mit RNA wurden, sofern vorhanden, Pyrogen-, *DNase*- und *RNase*-frei zertifizierte Chemikalien und Bioreagenzien verwendet. Für wässrige Lösungen und Puffer wurde gefiltertes, deionisiertes H₂O benutzt, das in einer *Astacus Life Science* Wasserreinigungsanlage von *membraPure* aufbereitet wurde. Alle Puffer wurden durch Filter von *Whatman* (Springfield Mill, England) steril filtriert. Plastikmaterialien wurden von den Firmen *Sarsted* (Nümbrecht), *Cotech* (Berlin) *Carl Roth* (Karlsruhe) oder *Starlab* (Ahrensburg) bezogen und waren ebenfalls Pyrogen-, *DNase*- und *RNase*-frei zertifiziert, wenn möglich. Pipettenspitzen wurden von den Firmen *Cotech*, *Carl Roth* oder *Starlab* erworben. Schwarze 384-Mikrotiterplatten (#781209) wurden bei *Greiner* (Kremsmünster, Österreich) und klare 96-Mikrotiterplatten (#82-0900-A) für die *realtime*-PCR bei *Peqlab* (Erlangen) geordert. NAP-5® (#17-0853-02) Säulen für die Größenausschlusschromatografie stammten von *VWR*, *Amicon Ultra*-0.5 ml Zentrifugenfilter, 3 K oder 10 K (#UFC500396, #UFC501096) von *Merck Millipore* (Billerica, USA) und *SYBR*® *Gold* (#S11494) von *Invitrogen* (Carlsbad, USA).

6-6.2 | Lösungen und Puffer

NH ₄ OAc	3 M, pH 7.5	143
10 × PUS-Puffer	1 M Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM MgCl ₂ , 1 M NH ₄ OAc	
1 × <i>Dicer</i> -Reaktionspuffer	20 mM Tris-HCl, pH 6.8, 12.5 mM NaCl, 2.5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT	
1 × <i>Dicer</i> -Verdünnungspuffer	20 mM Tris-HCl, pH 6.8, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 5 mM β-Mercaptoethanol, 10 % Glycerol, 0.1 % Triton-X 100	
TEAA-Puffer	0.1 M, pH 7.0	
10 × TBE-Puffer	0.89 M Tris-Borat, pH 8.0, 20 mM EDTA	
20 % denat. PAGE-Lösung	Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (19:1), 1:1 v/v verdünnt mit 8 M Harnstoff in 0.5 × TBE	
denat. PAGE-Verdünnungspuffer	0.5 × TBE in 8 M Harnstoff	
10 % native PAGE-Lösung	Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 40 % (19:1), 1:3 v/v verdünnt mit 0.5 × TBE	

Formamidladepuffer	90 % Formamid, 18 mM EDTA, 0.05 % Bromphenolblau
Sucrosladepuffer	0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 40 % (w/v) Sucrose, TEAA 0.1 M, pH 7.0
PCI (<i>Carl Roth</i>)	Phenol:CHCl ₃ :Isoamylalkohol (125:24:1, v/v/v)

6-6.3 | Enzyme, Kits, DNA- und RNA-Längenstandards, Oligonukleotide und Nukleotide

Die Längenstandards *miRNA Marker* (#N2102S) sowie *Low Range ssRNA Ladder* (#N0364S) wurden von *New England Biolabs* (Frankfurt) erworben, ebenso wie die *T4 RNA Ligase 1* (#M0204S), die *Bst*-DNA-Polymerase, *large fragment* (#M0275L), *Calf Intestinal Phosphatase* (#M0290S) und dNTPs (#N0447L). Von *Fermentas* (St. Leon-Rot) wurde *RiboLock*® (#EO0382), von *Epicentre* (Madison, USA) *CircLigase*TM *ssDNA Ligase* (#CL4111K) und von *Genlantis* (San Diego, USA) rekombinantes humanes *Dicer* (#T510002) bezogen. Die *in-vitro*-Transkriptionen wurden mit dem Kit *RiboMAX*TM *Large Scale RNA Production System-T7* (#P1300) von *Promega* (Madison, USA) durchgeführt. Die dafür benötigten DNA-Template und der T7-Promotor wurden in HPLC-Qualität von *Biotez* (Berlin), *Proligo* (Boulder, USA) oder *IBA* (Göttingen) geliefert. Das Alexa-Fluor®-633-markierte RNA-Oligomer wurde von *IBA* synthetisiert. Die für die BRCA benötigten linearen DNA-Template und Sekundärprimer wurden bei *IBA* oder *biomers.net* (Ulm) bestellt.

6-6.4 | DNA-Template, RNA-Oligomere und Primer

Für die *in-vitro*-Transkriptionen:

DNA-Templat Prä-Bantam | *Biotez* | 77 nt | MW = 23691 g mol⁻¹ | ϵ_{260} = 778100 l (mol cm)⁻¹ | c = 36.5 μ M | 5'- AAT CAG CTT TCA AAA TGA TCT CAC TTG TAT GAA AAA CAG TCA AAC CAA ATC GAA AAC CGC TAT AGT GAG TCG TAT TA -3'

DNA-Templat Prä-let-7 | *IBA* | 77 nt | MW = 23705 g mol⁻¹ | ϵ_{260} = 769400 l (mol cm)⁻¹ | c = 100 μ M | 5'- A_{OMe}C_{OMe}A AAG CTA GCA CAT TGT ATA GTA TGA TGT GTA ATT ACT ACT ATA CAA CCT ACT ACC TCC TAT AGT GAG TCG TAT TA -3'

DNA-Templat Prä-miR-21 | *IBA* | 76 nt | MW = 23512 g mol⁻¹ | ϵ_{260} = 748100 l (mol cm)⁻¹ | c = 100 μ M | 5'- A_{OMe}A_{OMe}G GCC CAT CGA CTG GTG TTG CCA TGA GAT TCA ACA GTC AAC ATC AGT CTG ATA AGC CCT ATA GTG AGT CGT ATT A -3'

DNA-Templat Prä-miR-142 | *Biotez* | 76 nt | MW = 23371 g mol⁻¹ | ϵ_{260} = 741700 l (mol cm)⁻¹ | c = 56.7 μ M | 5'- TCG ATA AAG TAG GAA ACA CTA CAC CCT CCA GTG CTG TTA GTA GTG CTT TCT ACT TTA TCT ATA GTG AGT CGT ATT A -3'

DNA-Templat Prä-miR-122 | *IBA* | 75 nt | MW = 23240 g mol⁻¹ | ϵ_{260} = 749900 l (mol cm)⁻¹ | c = 100 μ M | 5'- U_{OMe}A_{OMe}G TGA GTG TGA TAA TGG CGT TTG ATA GTT TAG ACA CAA ACA CCA TTG TCA CAC TCA CTA TAG TGA GTC GTA TTA -3'

DNA-Templat Prä-miR-122-A | *Biotez* | 65 nt | MW = 20048 g mol⁻¹ | ϵ_{260} = 648700 l (mol cm)⁻¹ | c = 50.0 μ M | 5'- G_{OMe}A_{OMe}T AAT GGC GTT TGA TAG TTT AGA CAC AAA CAC CAT TGT CAC ACT CAC TAT AGT GAG TCG TAT TA -3'

DNA-T7-Promotor | *Proligo* | 20 nt | MW = 6126 g mol⁻¹ | ϵ_{260} = 203900 l (mol cm)⁻¹ | c = 310 μ M | 5'- GGT AAT ACG ACT CAC TAT AG -3'

RNA-Oligomer Prä-miR-122-B^{ALX} | *IBA* | 10 nt | MW = 4285 g mol⁻¹ | ϵ_{260} = 99800 l (mol cm)⁻¹ | $\epsilon_{632,ALX}$ = 159000 l (mol cm)⁻¹ |^[181] c = 100 μ M | 5'- pACA CUC ACU A^{ALX} -3'

RNA-Oligomer Prä-miR-122-C | *IBA* | 10 nt | MW = 3088 g mol⁻¹ | ϵ_{260} = 99800 l (mol cm)⁻¹ | c = 100 μ M | 5'- pACA CUC ACU Ap -3'

Für den BRCA-Reifungsassay:

145

DNA Lin-let7 | *IBA* | 65 nt | MW = 19869 g mol⁻¹ | ϵ_{260} = 603400 l (mol cm)⁻¹ | c = 100 μ M | 5'- pTAC CTC AAT TTG CCT TGC ATT TCA GTT TAC GGT TTA GCA TTT CGC AAT TTT ACT ATA CAA CCT AC -3'

DNA Lin-Bantam | *IBA* | 62 nt | MW = 19156 g mol⁻¹ | ϵ_{260} = 634600 l (mol cm)⁻¹ | c = 100 μ M | 5'- pGCG TTA AGA ACA GTC AAA CCA AAT CGA AAA CCG CAA CGT AGA CTC AAA TGC CAA ATC GTA AA -3'

DNA Lin-21 | *IBA* | 64 nt | MW = 19770 g mol⁻¹ | ϵ_{260} = 649200 l (mol cm)⁻¹ | c = 100 μ M | 5'- pGCG TTA AGA CAA CAG TCA ACA TCA GTC TGA TAA GCC AAC GTA GAC TCA AAT GCC AAA TCG TAA A -3'

DNA Lin-122 | *IBA* | 64 nt | MW = 19621 g mol⁻¹ | ϵ_{260} = 631700 l (mol cm)⁻¹ | c = 100 μ M | 5'- pGCG TTA ACG AAA CCA AAC ACC ATT GTC ACA CTC ACC AAC GTA GAC TCA AAT GCC AAA TCG CAA A -3'

DNA-Sekundärprimer let7 | *Biomers* | 20 nt | MW = 6074 g mol⁻¹ | ϵ_{260} = 181200 l (mol cm)⁻¹ | c = 100 μ M | 5'- GCC TTG CAT TTC AGT TTA CG -3'

DNA-Sekundärprimer Bantam | IBA | 20 nt | MW = 6095 g mol⁻¹ | ϵ_{260} = 196200 l (mol cm)⁻¹ | c = 100 μ M | 5'- GCA ACG TAG ACT CAA ATG CC -3'

DNA-Sekundärprimer miR-21 und miR-122 | IBA | 20 nt | MW = 6055 g mol⁻¹ | ϵ_{260} = 193200 l (mol cm)⁻¹ | c = 100 μ M | 5'- CCA ACG TAG ACT CAA ATG CC -3'

6-6.5 | Molekularbiologische Messgeräte und Hilfsmittel

Bearbeitung der RNA-Molekülstrukturen | Die Molekülstrukturen aus Röntgenkristallstrukturanalysen wurden mit der Software *Jmol* bearbeitet.^[182]

Vorhersage der RNA-Sekundärstrukturen | Zur Modellierung hier gezeigter Sekundärstrukturen wurde die *RNA folding form* des *Mfold* Web Servers genutzt.^[183]

Programmierbare Heiz- und Kühlblockelemente | Temperatur-abhängige Reaktionen mit Volumina ≤ 200 μ l wurden im *Tgradient* der Firma *Biometra* (Göttingen) ausgeführt. Für größere Reaktionsvolumina wurde der *HeizThermoMixer MHR 13* von *HLC by Dita* (Pforzheim) verwendet.

Zentrifuge | Es wurde eine *Fresco*TM 17 von *Heraeus* verwendet.

146 **Fluoreszenz-Imager** | Für die Detektion fluoreszierender Banden in PAGE-Gelen kam die *Image Station 4000MM PRO* von *Kodak* (Stuttgart) mit $\lambda_{\text{ex}} = 470$ bzw. 630 nm und $\lambda_{\text{em}} = 535$ bzw. 700 nm zum Einsatz.

Präperative HPLC/UV-Vis | Prä-miRNAs wurden mit einem *1105 HPLC System* von *Gilson* (Middleton, USA) gereinigt. Die Detektion erfolgte mittels eines UV-Vis-Detektors bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm sowie 280 nm (unmodifizierte RNA), 485 nm (DAB- und FAM-modifizierte RNA) oder 633 nm (ALX-modifizierte RNA). Als Trennsäule diente eine auf 70 °C temperierte *XBridge C18*, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm, Porengröße 200 Å von *Waters*. Eluiert wurde mit dem Gradienten 0 \rightarrow 40 % MeCN in 0.1 M TEAA, pH 7 in 40 min bei einer Flussrate von 1 ml \times min⁻¹. Für die Endreinigung der ALX-modifizierten RNA-Oligomere wurde die Laufzeit auf 45 min erhöht.

Analytische UHPLC/UV-Vis/MS | Extern durchgeführte UHPLC/UV-Vis/MS-Analysen der RNA-Oligomere wurden an einem Gerät von *Agilent* durchgeführt. Die UV-Vis-Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 258$, 485 bzw. 600 nm und die Detektion der Massen eluierender Verbindungen mittels eines ESI-Q-TOF-Massenspektrometers. Als Trennsäule diente eine auf 70 °C temperierte *BEH C18*, 1.7 μ m, von *Waters*. Eluiert wurde mit dem Gradienten 0 \rightarrow 40 % MeOH in TEA und HFIP bei einer Flussrate von 0.3 ml \times min⁻¹. Genauere Angaben wurden nicht zur Verfügung gestellt. Daher werden kein Retentionszeiten angegeben. Die Berechnung der Massen erfolgte unter Berücksichtigung von terminalen Tri- oder Monophosphaten bzw. anderweitigen Modifizierungen.

gen mit dem online verfügbaren Programm *Oligo Analyzer 3.1* von *Integrated DNA Technologies*^[184] (Coralville, USA). Die UV-Vis-Chromatogramme sowie die gefundenen dekonvulierten Massen der eluierenden prä-miRNA sind im Anhang beigefügt

Konzentrationsbestimmungen mittels UV-Vis-Spektroskopie | Die Konzentrationen von DNA- und RNA-Oligomeren wurden am *ND1000* Spektrophotometer von *NanoDrop* (Wilmington, USA) bestimmt. Alle dafür benötigten molaren Extinktionskoeffizienten bei $\lambda = 260$ nm wurden unter Verwendung des *nearest-neighbour* Algorithmus mit dem online verfügbaren Programm *Oligo Analyzer 3.1* von *Integrated DNA Technologies*^[184] berechnet. Molare Extinktionskoeffizienten weiterer Bausteine wurden additiv einbezogen: $\epsilon_{260, \text{DAB}} = 11100 \text{ l (mol cm)}^{-1}$,^[185] $\epsilon_{468, \text{DAB}} = 32000 \text{ l (mol cm)}^{-1}$,^[185] $\epsilon_{260, \text{FAM}} = 20900 \text{ l (mol cm)}^{-1}$,^[185] $\epsilon_{495, \text{FAM}} = 75000 \text{ l (mol cm)}^{-1}$,^[185] $\epsilon_{632, \text{ALX}} = 159000 \text{ l (mol cm)}^{-1}$.^[181]

Fluoreszenz-Plattenleser | Fluoreszenzmessungen wurden in schwarzen 384-Mikrotiterplatten an einem *FLUOstar OPTIMA* von *BMG Labtech* (Offenburg) bei 37 °C über 3 h durchgeführt. Es wurden Anregungs- und Emissionsfilter mit einer Schlitzbreite von 10 nm bei $\lambda_{\text{ex}} = 485$ nm und $\lambda_{\text{em}} = 520$ nm benutzt.

Fluoreszenzspektroskopie | Die Fluoreszenzspektren wurden an einem *Cary Eclipse* Gerät von *Varian* in 3 × 3 mm Ultra-Mikro-Küvetten aufgenommen. Weitere Details wie Anregungswellenlängen und Schlitzbreiten, finden sich bei den entsprechenden Abbildungen.

147

realtime-PCR-Thermocycler | Die Amplifikation und Detektion des Fluoreszenzsignals im BRCA-Assay wurde an einem *iQ5 Real-Time PCR Detection System* der Firma *BioRad* (Hercules, USA) bei 57 °C in klaren 96er-Mikrotiterplatten durchgeführt. Für die Anregung und Emission diente ein Filterpaar $\lambda_{\text{ex}} = (485 \pm 20)$ nm und $\lambda_{\text{em}} = (530 \pm 20)$ nm.

6-6.6 | Molekularbiologische Methoden

RNase-freies Arbeiten | Um Degradierung von RNA durch ubiquitär-vorhandene *RNasen* zu minimieren, wurden jegliche Glas- oder Metallwaren 3 h bei 250 °C erhitzt, alle Oberflächen regelmäßig mit einer 3%igen NaOCl-Lösung behandelt und mit H₂O der Qualitätsstufe 1 gespült. Es wurden grundsätzlich Einweghandschuhe verwendet, die zusätzlich mit einer 3%igen NaOCl-Lösung benetzt und mit kommerziell verfügbaren gebleichten Papiertüchern abgetupft wurden.

PCI-Extraktion | Die wässrige RNA-Lösung wurde mit PCI (1:1, v/v) versetzt, 30 sek durch Vibration durchmischt, geschüttelt und anschließend 3 min bei RT und 17000 g zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Mikroreaktionsgefäß überführt und der Vorgang mit frischem PCI wiederholt. Gegebenenfalls kann eine Reextraktion der PCI-Phase mit H₂O erfolgen. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt.

RNA-Präzipitation | Zu der wässrigen RNA-Lösung wurde 3 M NH_4OAc , pH 7.5 gegeben, sodass die finale Konzentration bei 0.3 M lag. Anschließend wurde das zwei- bis dreifache Volumen von -20°C kaltem EtOH langsam zugefügt, die Suspension durch Vibration durchmischt und danach über Nacht bei -20°C gelagert. Durch 30-minütiges Zentrifugierung bei 4°C , 17000 g, wurde der Niederschlag zu einem Pellet sedimentiert und EtOH abdekantiert. Der Rückstand wurde mit dem zweifachen Volumen -20°C kaltem 80%igem EtOH versetzt. Diese Lösung wurde 30 sek durch Vibration durchmischt und anschließend 20 min bei 4°C , 17000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipetiert, der Niederschlag zum Trocknen bei 37°C inkubiert und abschließend in H_2O aufgenommen.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) | Alle Gelelektrophoresen wurden in einem *MiniPROTEAN® Tetra Cell* der Firma *BioRad* durchgeführt. Zu 5 ml nat. oder denat. PAGE-Lösung wurden 25 μl 10%ige APS und 5 μl TEMED nacheinander zugefügt. Die Lösung wurde durch Vibration durchmischt und im Anschluss zügig zwischen zwei arretierte Glasplatten gegossen und der Probenkamm eingesetzt. Nach 45 min war die Polymerisation abgeschlossen und das Gel wurde in der Spannungskammer fixiert. Die Kammer wurde mit $0.5 \times \text{TBE}$ gefüllt und 30 min bei entsprechender Laufspannung (10%ig nat. 150 V, 20%ig denat. 230 V) vorgewärmt. Bei denat. PAGE-Gelen wurden die Taschen vor dem Beladen mit Analyt vom abgesetzten Harnstoff freigespült. Nach der Auftrennung wurde das Gel 10 min in einer 1:20000 verdünnten *SYBR®-Gold*-Lösung in $0.5 \times \text{TBE}$ inkubiert und die Banden abschließend in der Image-Station von *Kodak* visualisiert. Gele mit fluoreszierenden RNA-Derivaten wurden zunächst ohne zusätzliche Färbungsreagenzien untersucht.

In-vitro-Transkription | Für alle *in-vitro*-Transkriptionen wurde das Kit *RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7* verwendet. Exemplarisch ist die Zusammensetzung der Reaktionslösung für einen 300 μl Ansatz mit einer Templat-Konzentration von 100 μM aufgeführt (Tab. 6-3). Um den doppelsträngigen *T7*-Promotor zu generieren, wurden in einem 1.5 ml Mikroreaktionsgefäß H_2O , Templat und Promotor 2 min auf 95°C erhitzt und dann 10 min bei RT stehen gelassen. Anschließend wurden die tabellierten Mengen an Puffer, MgCl_2 , rNTPs, **GMP^{Prg}** und Enzym-Mix addiert. Die Reaktionslösung wurde auf 37°C erwärmt und alle 8×15 min mit einem weiteren Aliquot GTP versetzt. Nach der letzten Zugabe wurde die Reaktion für 30 min fortgesetzt und durch Zusatz von *DNase* nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C beendet. Nach PCI-Extraktion, EtOH-Präzipitation und Lösen in 150 μl H_2O wurde das Transkript ohne zusätzliche Reinigung für die CuAAC eingesetzt.

Tab. 6-3 | Pipettierschema der *in-vitro*-Transkription

Komponente	C _{Stock}	C _{Final}	V [μ l]
H ₂ O	-	-	45
T7-Promotor	310 μ M	7.47 μ M	7.20
DNA-Templat	100 μ M	3.73 μ M	11.2
T7-Puffer	5 \times	1 \times	60.0
MgCl ₂	1 M	10 mM	3.00
rNTPs	25 mM ACU, 2.50 mM G + 100 mM G	7.5 mM, 0.75 mM + 8 \times 0.84 mM	90.0 + 8 \times 2.52
GMP ^{Prg}	37.8 mM	6.75 mM	53.6
Enzym-Mix	10 \times	1 \times	30.0
Summe			300
DNase	2 U μ l ⁻¹		45

CuAAC mit FAM-N₃/DAB-N₃ | Ausgehend von einem 300 μ l *in-vitro*-Transkriptionsansatz wurden die ungereinigten RNA-Transkripte in einem 1.5 ml Mikroreaktionsgefäß mit H₂O und Puffer (Tab. 6-4) verdünnt. Die NaAsc-Lösung wurde kurz vor Gebrauch hergestellt und ebenso wie die Stammlösungen THPTA und Azid vor Zugabe zur Reaktionslösung mit einem scharfen Argongasstrom durch eine Eppendorf-Spitze 10 sek entgast. Diese Lösungen wurden anschließend in der tabellierten Reihenfolge zur RNA-Lösung pipettiert und die resultierende Reaktionslösung erneut 10 sek entgast. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Spitze in die Lösung nicht eintauchte, sondern dass diese lediglich in kreisenden Bewegungen vom Gasstrom durchspült wurde. Nach 2 h Schütteln (250 rpm) bei 25 °C unter Lichtausschluss wurde eine PCI-Extraktion durchgeführt, wobei der PCI-Phase EDTA in einer Endkonzentration von 10 mM zugesetzt wurde. Eine Amicon-Ultrazentrifugation, 3 K nach Herstellerangaben, trennte nicht-inkorporierte Ribonukleotide der *in-vitro*-Transkription und alle anderen kleinen Moleküle ab. Der Rückstand wurde anschließend durch HPLC mit dem Gradienten 0→40 % MeCN in 0.1 M TEAA, pH 7 gereinigt. Dabei wurden ^{DAB}prä-miRNAs ($t_R \sim 34$ min) und unmodifizierte prä-miRNAs ($t_R \sim 22$ min) voneinander separiert und die entsprechenden Fraktionen mit Zentrifugenfiltern (3 K) nach Herstellerangaben entsalzt und aufkonzentriert. War der Ansatz wie im Fall der internen Markierungsexperimente sehr klein, wurde das Pipettierschema abgewandelt (Tab. 6-5)

Tab. 6-4 | Pipettierschema der CuAAC mit ungereinigten prä-miR-Transkripten | Die Konzentration der Transkripte wurde aufgrund des Überschusses an rNTPs aus der *in-vitro*-Transkription nicht bestimmt.

Komponente	C _{Stock}	C _{Final}	V [μl]
H ₂ O	-	-	64.5
PUS-Puffer	10 ×	1 ×	30
Prä-miR-Transkript	n.b.	n.b.	150
DAB-N₃ (in DMSO)	10 mM	500 μM	15
THPTA	50 mM	3.75 mM	22.5
NaAsc	150 mM	7.5 mM	15
CuSO ₄	75 mM	0.75 mM	3
Summe			300

Tab. 6-5 | Pipettierschema der CuAAC für kleine Ansätze

Komponente	C _{Stock}	C _{Final}	V [μl]
H ₂ O	-	-	34.7
PUS-Puffer	10 ×	1 ×	10
Prä-miRNA	7.5 μM	5 μM	35
FAM-N₃ (in DMSO)	1 mM	100 μM	10
THPTA	50 mM	5 mM	5
NaAsc	150 mM	2.5 mM	3.3
CuSO ₄	25 mM	0.5 mM	2
Summe			100

150

^{DAB}prä-let7 | 60 nt | $\epsilon_{260} = 642000 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | $n = 0.89 \text{ nmol}$ | 5'- DAB-GGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU AGU AAU UAC ACA UCA UAC UAU ACA AUG UGC UAG CUU UGU -3'

prä-let7 | 60 nt | $\epsilon_{260} = 630900 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | $n = 1.57 \text{ nmol}$ | 5'-pppGGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU AGU AAU UAC ACA UCA UAC UAU ACA AUG UGC UAG CUU UGU -3' | ESI-MS (dekonvuliert) aus UHPLC/UV-Vis/MS ber. 19502.4, gef. 19502.4

Isolierte Ausbeute $n_{\text{total}} = 2.46 \text{ nmol}$ (36 % ^{DAB}prä-let7, 64 % prä-let7)

^{DAB}prä-miR-21 | 59 nt | $\epsilon_{260} = 589000 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | $n = 0.65 \text{ nmol}$ | 5'- DAB-GGG CUU AUC AGA CUG AUG UUG ACU GUU GAA UCU CAU GGC AAC ACC AGU CGA UGG GCC UU -3'

prä-miR-21 | 59 nt | $\epsilon_{260} = 577900 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | $n = 1.84 \text{ nmol}$ | 5'- pppGGG CUU AUC AGA CUG AUG UUG ACU GUU GAA UCU CAU GGC AAC ACC AGU CGA UGG GCC UU -3' | ESI-MS (dekonvuliert) aus UHPLC/MS ber. 19153.2, gef. 19153.3

Isolierte Ausbeute $n_{\text{total}} = 2.49 \text{ nmol}$ (26 % ^{DAB}prä-miR-21, 74 % prä-miR-21)

^{DAB}prä-mir-142 | 59 nt | $\epsilon_{260} = 621400 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | $n = 0.41 \text{ nmol}$ | 5'- DAB-GAU AAA GUA GAA AGC ACU ACU AAC AGC ACU GGA GGG UGU AGU GUU UCC UAC UUU AUC GA -3' | ESI-MS (dekonvuliert) aus UHPLC/UV-Vis/MS ber. 19519.6, gef. 19519.8

prä-miR-142 | 59 nt | $\epsilon_{260} = 610300 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | $n = 0.68 \text{ nmol}$ | 5'- pppGAU AAA GUA GAA AGC ACU ACU AAC AGC ACU GGA GGG UGU AGU GUU UCC UAC UUU AUC GA -3' | ESI-MS (dekonvuliert) aus UHPLC/UV-Vis/MS ber. 19216.3, gef. 19216.3

Isolierte Ausbeute $n_{\text{total}} = 1.09 \text{ nmol}$ (38 % ^{DAB}prä-mir-142, 62 % prä-miR-142) mit einem Drittel der tabellierten Ansatzgröße

^{DAB}**Prä-miR-122** | 58 nt | $\epsilon_{260} = 595700 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | $n = 0.56 \text{ nmol}$ | 5'- DAB-GUG AGU GUG ACA AUG GUG UUU GUG UCU AAA CUA UCA AAC GCC AUU AUC ACA CUC ACU A -3'

prä-miR-122 | 58 nt | $\epsilon_{260} = 584600 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | $n = 2.05 \text{ nmol}$ | 5'- pppGUG AGU GUG ACA AUG GUG UUU GUG UCU AAA CUA UCA AAC GCC AUU AUC ACA CUC ACU A -3' | ESI-MS (dekonvuliert) aus UHPLC/UV-Vis/MS ber. 18745.0, gef. 18745.2

Isolierte Ausbeute $n_{\text{total}} = 2.61 \text{ nmol}$ (21 % ^{DAB}Prä-miR-122, 79 % prä-miR-122)

^{DAB}**Prä-miR-122-A** | 48 nt | $\epsilon_{260} = 497500 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | $n = 0.73 \text{ nmol}$ | 5'- DAB-GUG AGU GUG ACA AUG GUG UUU GUG UCU AAA CUA UCA AAC GCC AUU AUC -3'

prä-miR-122-A | 48 nt | $\epsilon_{260} = 486400 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | $n = 1.67 \text{ nmol}$ | 5'- pppGUG AGU GUG ACA AUG GUG UUU GUG UCU AAA CUA UCA AAC GCC AUU AUC -3' | ESI-MS (dekonvuliert) aus UHPLC/UV-Vis/MS ber. 15595.1, gef. 15595.2

Isolierte Ausbeute $n_{\text{total}} = 2.40 \text{ nmol}$ (30 % ^{DAB}Prä-miR-122-A, 70 % prä-miR-122-A)

151

Ligation von pUp^{Alk} oder pUp^{FAM} | Zur Ligation von pUp^{Alk} oder pUp^{FAM} an das 3'-OH Ende der RNA wurde die *T4 RNA Ligase 1* benutzt. Die Verbindung pUp^{FAM} wurde in einem Gemisch aus DMSO/H₂O (3:2, v/v) und pUp^{Alk} in H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert. Für die Ligation wurden Puffer, H₂O, RNA und DMSO in einem 1.5 ml Mikroreaktionsgefäß zusammengefügt, 3 min auf 95 °C erhitzt und dann 5 min auf Eis gestellt (Tab. 6-6). Modifiziertes Uridin und ATP wurden addiert, der Ansatz erneut für 5 min auf Eis gestellt. Dann wurden RNase Inhibitor sowie Ligase zugesetzt. Der Reaktionsansatz wurde durch Vibration durchmischt, auf 200 µl PCR-Vials verteilt und im Thermocycler 20 h bei einer Temperatur von 16 °C gehalten. Anschließend wurde durch PCI-Extraktion das Enzym entfernt und das Rohprodukt bei Verwendung von pUp^{FAM} durch HPLC mit dem Gradienten 0→40 % MeCN in 0.1 M TEAA, pH 7 gereinigt ($t_R \sim 36 \text{ min}$). Die produktenenthaltenden Fraktionen wurden durch Filtration mit *Amicon Ultra-0.5 ml* Zentrifugenfilter, 3 K aufkonzentriert und entsalzt. Wurde pUp^{Alk} als Ribonukleotid eingesetzt, wurde nur durch Filtration mit Zentrifugenfiltern (3 K) gereinigt.

Tab. 6-6 | Pipettierschema der Ligation mit pUp^{Alk} und pUp^{FAM}

Komponente	c _{Stock}	c _{Final}	V [μl]
H ₂ O	-	-	53.2
<i>T4-RNA-Ligase-1</i> -Puffer	10 ×	1 ×	15
Prä-miR	13 μM	1.75 μM	20
DMSO	100 %	20 %	30
pUp ^{Alk} oder pUp ^{FAM}	25 mM	0.65 mM	3.9
ATP	10 mM	1 mM	15
RiboLock®	40 U μl ⁻¹	0.70 U μl ⁻¹	2.5
<i>T4 RNA Ligase 1</i>	10 U μl ⁻¹	0.70 U μl ⁻¹	10
Summe			150

Prä-let7^u | 61 nt | $\varepsilon_{260} = 640600 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | $n = 0.43 \text{ nmol (87 \%)}$ | 5'- ppp-GGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU AGU AAU UAC ACA UCA UAC UAU ACA AUG UGC UAG CUU UGUp-Ethynyl-3' | ESI-MS (dekonvuliert) aus UHPLC/UV-Vis/MS ber. 19912.6, gef. 19912.3

DABPrä-let7^{FAM} | 61 nt | $\varepsilon_{260} = 672600 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | $n = 0.60 \text{ nmol (56 \%)}^*$ | 5'- DAB-GGA GGU AGU AGG UUG UAU AGU AGU AAU UAC ACA UCA UAC UAU ACA AUG UGC UAG CUU UGUp-FAM -3' | ESI-MS (dekonvuliert) aus UHPLC/UV-Vis/MS ber. 20748.0, gef. 20748.6

DABPrä-miR-21^{FAM} | 60 nt | $\varepsilon_{260} = 619600 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | $n = 0.26 \text{ nmol (44 \%)}^*$ | 5'- DAB-GGG CUU AUC AGA CUG AUG UUG ACU GUU GAA UCU CAU GGC AAC ACC AGU CGA UGG GCC UUUUp-FAM -3' | ESI-MS (dekonvuliert) aus UHPLC/UV-Vis/MS ber. 20398.8, gef. 20399.3

DABPrä-miR-142^{FAM} | 60 nt | $\varepsilon_{260} = 650900 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | $n = 0.10 \text{ nmol (39 \%)}^*$ | 5'- DAB-GAU AAA GUA GAA AGC ACU ACU AAC AGC ACU GGA GGG UGU AGU GUU UCC UAC UUU AUC GAUp-FAM -3' | ESI-MS (dekonvuliert) aus UHPLC/UV-Vis/MS ber. 20461.9, gef. 20462.4

DABPrä-miR-122^{FAM} | 59 nt | $\varepsilon_{260} = 625200 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | $n = 0.40 \text{ nmol (59 \%)}^*$ | 5'- DAB-GUG AGU GUG ACA AUG GUG UUU GUG UCU AAA CUA UCA AAC GCC AUU AUC ACA CUC ACU AUUp-FAM -3' | ESI-MS (dekonvuliert) aus UHPLC/UV-Vis/MS ber. 19990.5, gef. 19991.2

Ligation von kurzen prä-miR-122-BALX/C | Zur Ligation der prä-miR-122-BALX an die prä-miR-122-A bzw. ^{DAB}prä-miR-122-A wurde ebenfalls die *T4 RNA Ligase 1* benutzt. (Tab. 6-7). Eine Lösung aus Puffer, H₂O, und beiden RNA-Oligomeren wurde in einem 1.5 ml Mikroreaktionsgefäß 3 min auf 95 °C erhitzt und dann 5 min auf Eis gestellt. ATP und DMSO wurden addiert, der Ansatz für 5 min auf Eis gekühlt und dann *RNase*-Inhibitor sowie Ligase zugesetzt. Der Reaktionsansatz wurde vermischt, auf 250 μl PCR-Vials verteilt und im Thermocycler 20 h bei einer Temperatur von 16 °C gehalten. Zweimalige PCI-Extraktion entfernte die Enzyme und eine HPLC mit dem Gradienten 0→40 % MeCN in 0.1 M TEAA, pH 7 ermöglichte die Abtrennung der überschüssigen prä-miR-122-BALX ($t_R \sim 36 \text{ min}$) vom ligierten Produkt ^{DAB}prä-miR-122^{ALX} ($t_R \sim 41 \text{ min}$). Die produktenthaltenden Fraktionen wurden durch Filtration mit Zentrifugenfiltern (3 K) aufkonzentriert und entsalzt. Die Ligation der **prä-miR-**

* Die Ausbeuten beziehen sich auf die isolierten Mengen nach HPLC-Reinigung. Die extern durchgeführten UHPLC/UV-VIS/MS-Analysen der prä-miRs belegte deren Identität und Reinheit.

122-C erfolgte analog, aber mit zehnfachem Überschuss bezüglich der prä-miR-122-A bzw. prä-let7.

Tab. 6-7 | Pipettierschema der Ligation mit prä-miR-122-B

Komponente	C _{Stock}	C _{Final}	V [μl]
H ₂ O	-	-	113.1
<i>T4-RNA-Ligase-1-Puffer</i>	10 ×	1 ×	26
(DAB)Prä-miR-122-A	~15 μM	3 μM	45
DMSO	100 %	10 %	26
Prä-miR-122-B ^{ALX}	100 μM	9 μM	23.4
ATP	10 mM	1mM	26
RiboLock®	40 U μl ⁻¹	0.75 U μl ⁻¹	4.88
<i>T4 RNA Ligase 1</i>	10 U μl ⁻¹	1 U μl ⁻¹	26
Summe			260

DABPrä-miR-122^{ALX} | 58 nt | $\epsilon_{260} = 595700 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | n = 0.20 nmol (29 %) | * 5'- DAB-GUG AGU GUG ACA AUG GUG UUU GUG UCU AAA CUA UCA AAC GCC AUU AUC -3' | ESI-MS (dekonvuliert) aus UHPLC/UV-Vis/MS ber. 20165.8, gef. 20166.3

Prä-miR-122^{ALX} | 58 nt | $\epsilon_{260} = 584600 \text{ l (mol cm)}^{-1}$ | n = 0.05 nmol (16 %) | 5'- DAB-GUG AGU GUG ACA AUG GUG UUU GUG UCU AAA CUA UCA AAC GCC AUU AUC -3'

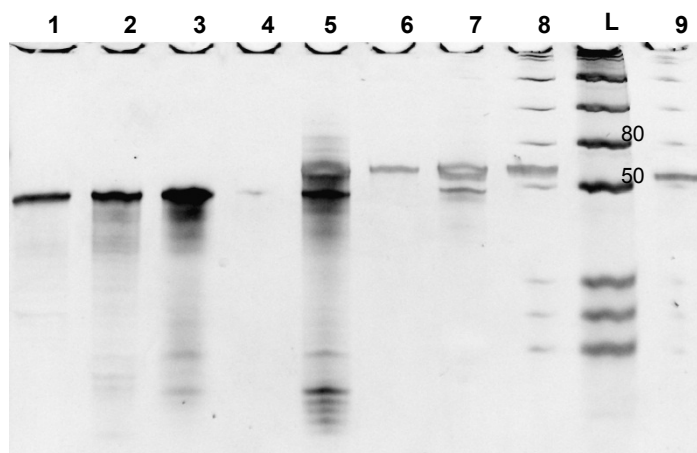


Abb. 6-2 | 20 %iges denat. Page nach der Ligation | Legende: 1 = DABPrä-miR-122, 2 und 3 = Prä-miR-122-A in verschiedenen Konzentrationen, 4 = Prä-miR-122-B, 5 = Prä-miR-122^{ALX} vor HPLC, 6 = Prä-miR-122^{ALX} nach HPLC, 7 = DABPrä-miR-122^{ALX} vor HPLC, 8 = DABPrä-miR-122^{ALX} nach HPLC, 9 = prä-miR-122, 8 und 9 sind verunreinigt mit L RNA-Leiter.

Dephosphorylierung mit CIP | Phosphate wurden durch Behandlung mit *Calf Intestinale Phosphatase* (CIP) entfernt. Dazu wurde RNA mit dem dazugehörigen Puffer Nr. 3 und H₂O auf 3 μM verdünnt und mit 4 U CIP (10 U μl⁻¹) pro 0.1 nmol RNA versetzt, 1h bei 37 °C inkubiert und die wässrige Phase abschließend durch PCI-Extraktion sowie Zentrifugenfiltration gereinigt und aufkonzentriert.

* Die Ausbeute bezieht sich auf die isolierten Mengen nach HPLC-Reinigung. Die extern durchgeführte UHPLC/UV-Vis/MS-Analyse der Zellsonde DABprä-miR-122^{ALX} belegte Identität und Reinheit der RNA.

6-6.7 | Durchführung der Reifungsassays

Fluoreszenzbasierter Reifungsassay [163b] Der fluoreszenzbasierte Assay wurde in schwarzen 384-Mikrotiterplatten mit einem Endvolumen von 40 µl und mit Dreifachbestimmung durchgeführt. Die prä-miRNA-Sonde (let7, 122, 21, 142) wurde mit *Dicer*-Verdünnungspuffer auf 400 nM verdünnt, 3 min auf 95 °C erhitzt und innerhalb von 30 min auf RT gebracht. Von dieser Stammlösung wurden 2 µl entnommen, in das *Well* einer Mikrotiterplatte pipettiert und mit 3.8 µl 10 × *Dicer*-Verdünnungspuffer sowie 30.2 µl H₂O verdünnt. Die Mikrotiterplatte wurde anschließend auf Eis gestellt, 4 µl *Dicer* bzw. bei 95 °C denat. *Dicer*, 40-fach verdünnt (0.0125 U µl⁻¹) in 1 × *Dicer*-Reaktionspuffer dazugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt (Endkonzentration Sonde/*Dicer*: 20 nM/0.05 U). Der Fluoreszenzanstieg wurde bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C über 3 h im Fluoreszenz-Plattenleser verfolgt.

BRCA-basierter Reifungsassay [110] Die Herstellung der Prä-miRNAs erfolgte durch *in-vitro*-Transkription und wurde von Dipl.-Chem. Marlen Hesse durchgeführt ebenso wie die Cyclisierung der linearen DNA-Template mit Hilfe des Kits *CircLigase™ ssDNA Ligase*. Der Assay wurde unter kompetitiven Bedingungen durchgeführt, d.h. entweder die prä-miR-21 und prä-miR-122 oder die prä-let7 und prä-Bantam wurden in Anwesenheit potentieller Inhibitoren paarweise der *Dicer*-vermittelten Spaltung unterworfen. Für die relative Quantifizierung wurden zusätzlich Positiv- (ohne Testsubstanz) und Negativkontrollen (ohne Testsubstanz und *Dicer*) durchgeführt. Die Assays an prä-mir-21/122 sowie die Bestimmung der IC₅₀-Kurven wurden von Dipl.-Chem. Marlen Hesse durchgeführt.

154

Die *Dicer*-Inkubation erfolgte in 40 µl Reaktionsvolumen in 1 × *Dicer*-Verdünnungspuffer (Tab. 6-8). Dazu wurden die renaturierten prä-miRs A und B paarweise in 200 µl 8er PCR-Streifen vorgelegt, verdünnt und dann zusammen mit der Testsubstanz 30 min bei RT vorinkubiert. Danach erfolgte bei RT die Zugabe von *Dicer*. Der Ansatz wurde 2 h bei 37 °C im Thermocycler inkubiert und danach auf Eis gestellt. Von jedem Reifungsansatz wurden Volumina von je 6 × 5 µl entnommen und in die *Wells* einer klaren 96-Mikrotiterplatte (0 °C) verteilt. Für die Kontrollmessungen wurden die Inhibitoren erst nach der *Dicer*-Prozessierung in entsprechender Verdünnung zugegeben. Für prä-let7/Bantam wurden die Bibliotheksmitglieder mit D und D* bei einer Endkonzentration von 5 µM und mit N bei 0.5 µM getestet. Für prä-miR-21/122 wurden die 2-DOS-Konjugate bei 1 µM und Neamindimere bei 0.1 µM getestet.

Tab. 6-8 | Pipettierschema des Reifungsansatzes

Komponente	C _{Stock}	C _{Final}	V [µl]
<i>Dicer</i> -Verdünnungspuffer	1 ×	1 ×	21.2/11.2
Prä-miR A (in 1 × <i>Dicer</i> -Verdünnungspuffer)	1 µM	50 nM	2
Prä-miR B (in 1 × <i>Dicer</i> -Verdünnungspuffer)	1 µM	50 nM	2
Testsubstanz (in 1 × <i>Dicer</i> -Verdünnungspuffer)	20/1 µM	5/0.5 µM	10/20
<i>Dicer</i> (in 1 × <i>Dicer</i> -Verdünnungspuffer)	50 U ml ⁻¹	6 U µl ⁻¹	4.8
Summe			40

Zur Visualisierung der *Dicer*-Prozessierung wurden zwei auf 4 °C gekühlte BRCA-Gemische der entsprechenden prä-miRs mit *Bst* versetzt und durch Vibration vermischt (Tab. 6-9). Davon wurden 15 µl zu den mit Eis gekühlten *Dicer*-Reifungsansätzen addiert. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie bedeckt und der Fluoreszenzanstieg im *realtime*-PCR-Thermocycler über 3 h bei 57 °C ausgelesen.

Zur Bestimmung der inhibitorischen Potenz der Verbindungen wurden die Fluoreszenzanstiege zwischen $t_1 = 20$ min und $t_2 = 60$ min durch lineare Regression bestimmt, mithilfe der Negativkontrollen korrigiert und abschließend mit der Positivkontrolle ins Verhältnis gesetzt. Die Berechnung der IC_{50} -Werte erfolgte mit dem Programm *GraphPadPrism 6.0*.^[186]

Tab. 6-9 | Pipettierschema für einen BRCA-Mastermix A oder B

Komponente	c_{Stock}	c_{Final}	V [µl]
H ₂ O	-	-	5
Thermopol-Puffer	10 ×	1 ×	2
dNTPs	2 mM	200 µM	2
Sekundärprimer A oder B	2 µM	200 nM	2
<i>SYBR® Gold</i>	1:1000	1:20000	1
zirkuläres DNA-Templat	50 nM	2.5 nM	1
DMSO	100 %	5 %	1
<i>Bst</i> -DNA-Polymerase	8 U µl ⁻¹	0.4 U µl ⁻¹	1
Summe			15

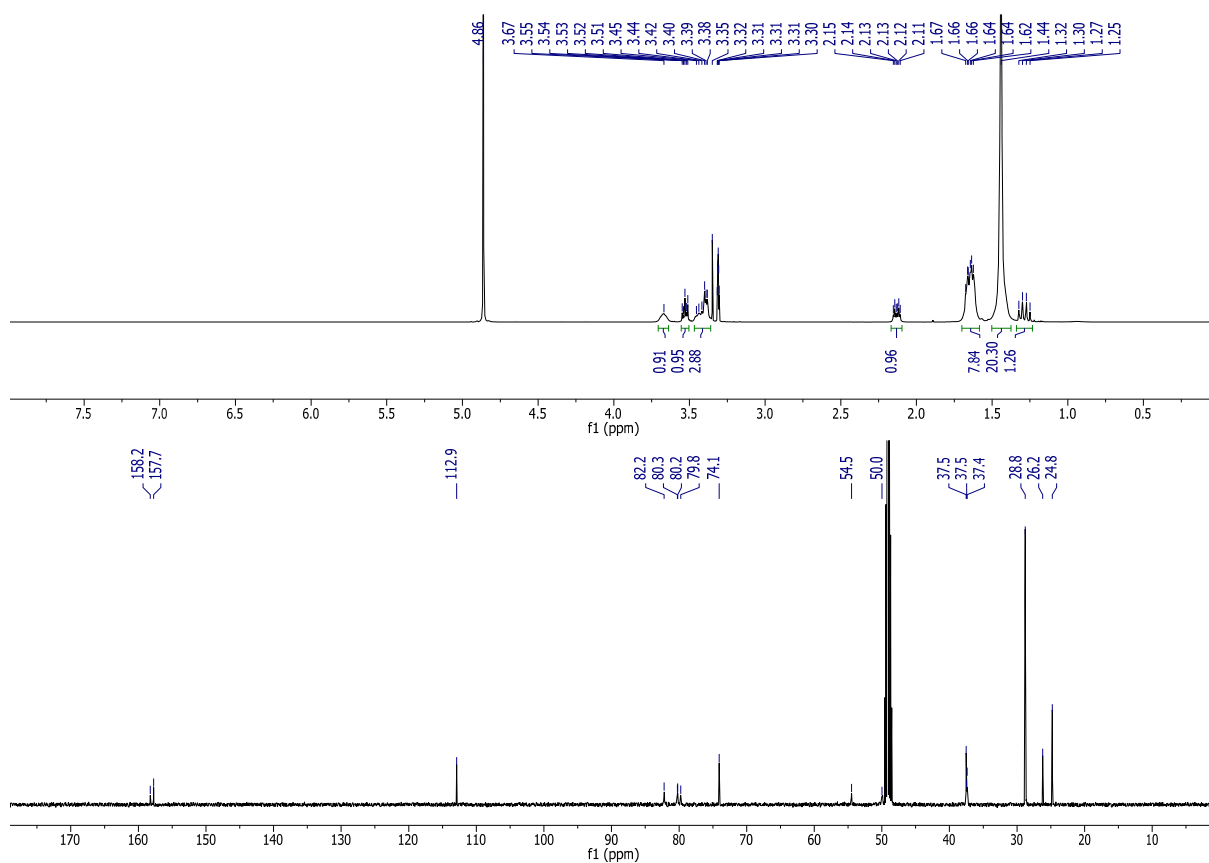
7 | Anhang

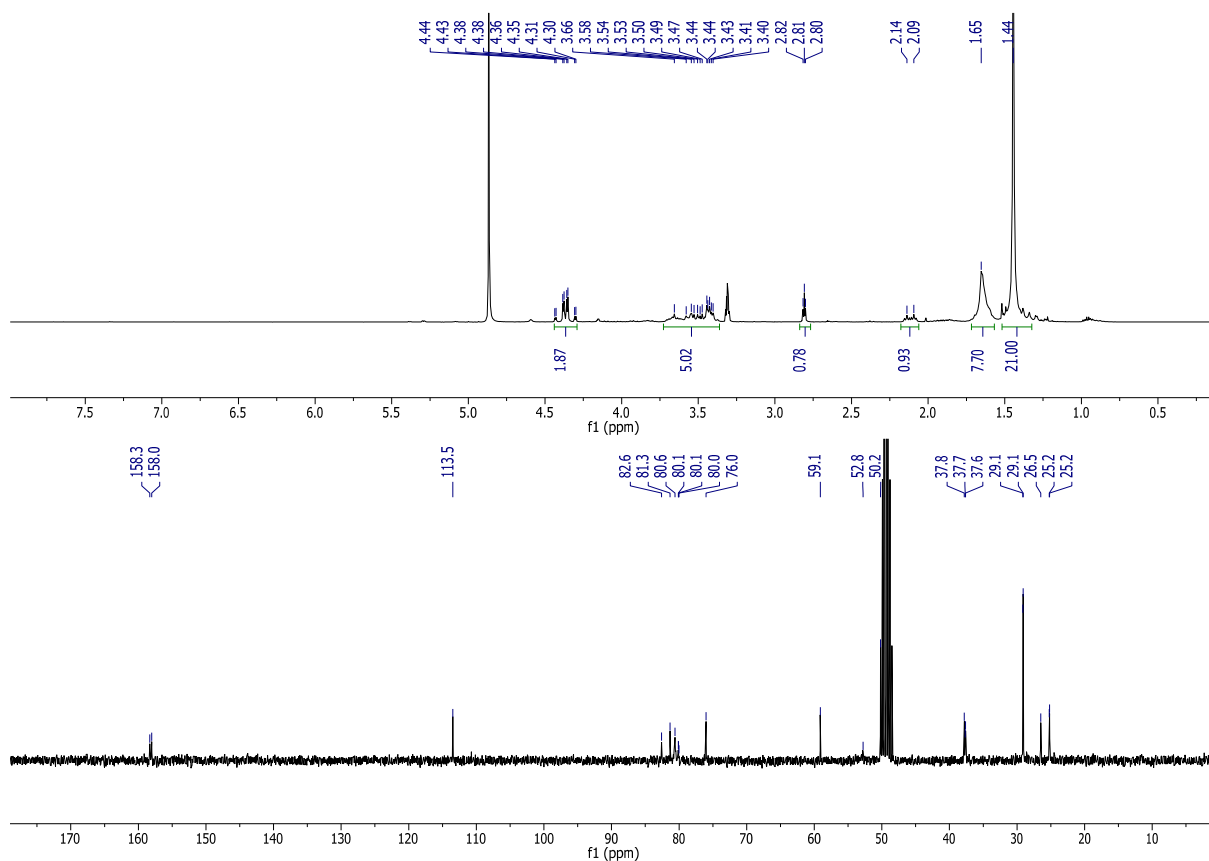
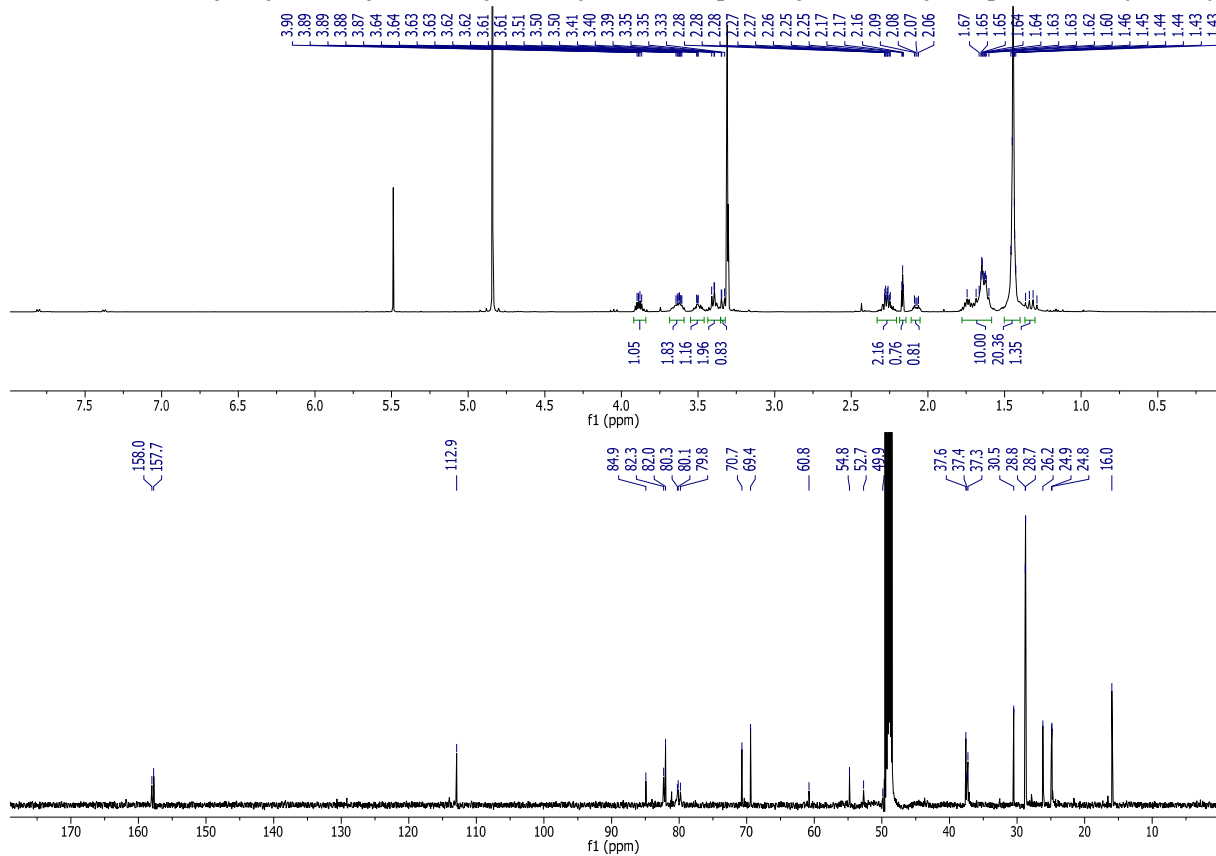
In Ergänzung zu den hier abgebildeten NMR-Spektren, Chromatogrammen und Inhibitionswerten werden weitere Abbildungen und Daten (u. a. NMR-Spektren der Bisazide sowie der Substanzbibliothek-Mitglieder, Inhibitionswerte des Screenings in tabellarischer Form) auf einer beigelegten Daten-CD zur Verfügung gestellt.

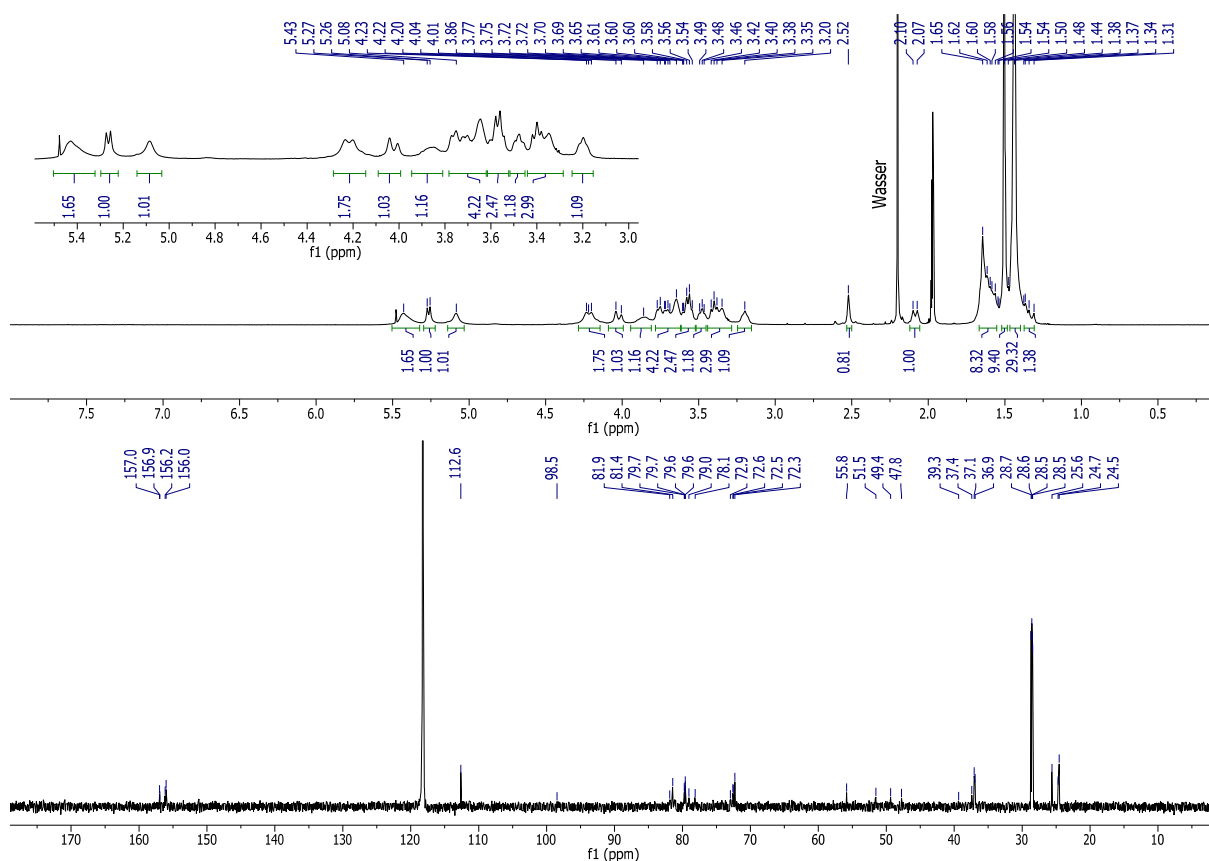
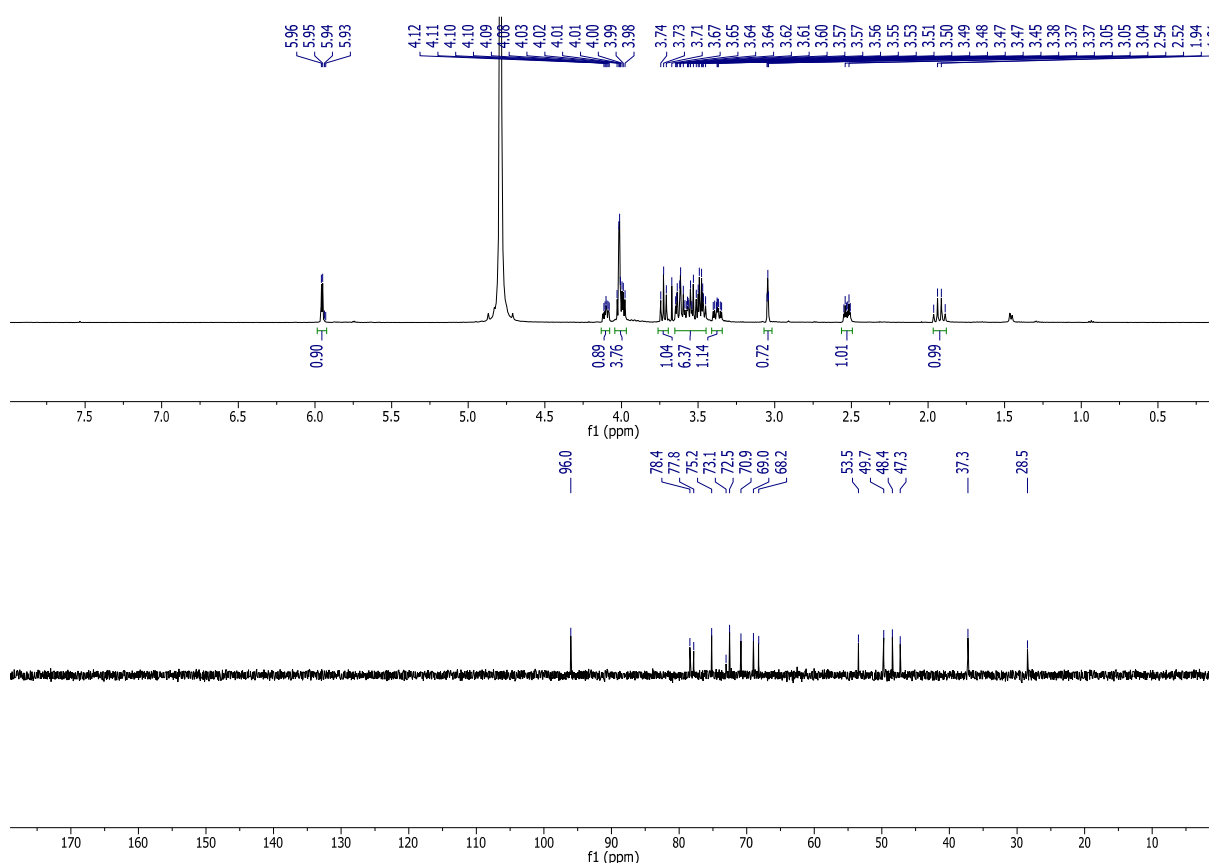
7-1 | NMR-Spektren

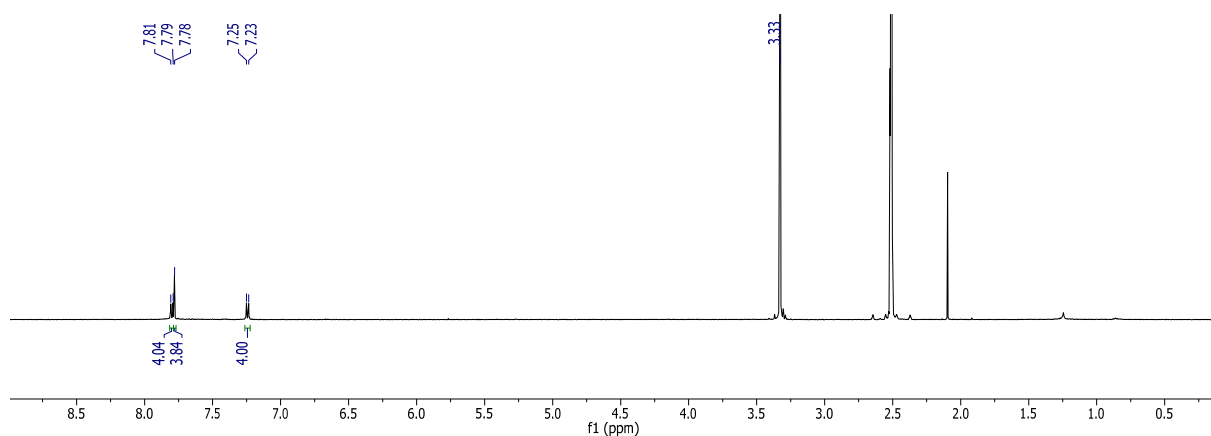
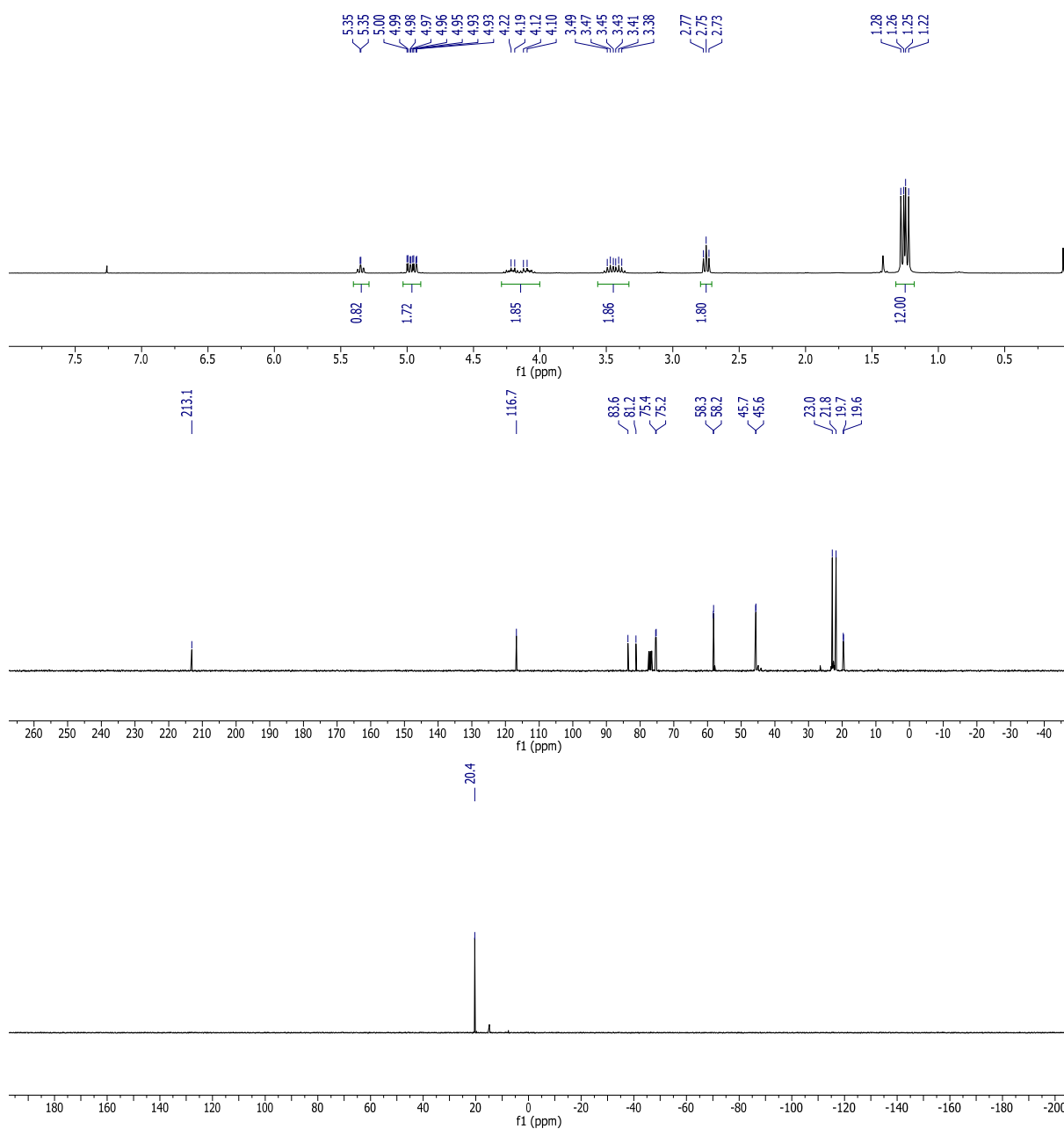
1,3-Di-*N-tert*-butyloxycarbonyl-5,6-*O*-cyclohexylden-2-desoxystreptamin 40 (CD₃OD)

157

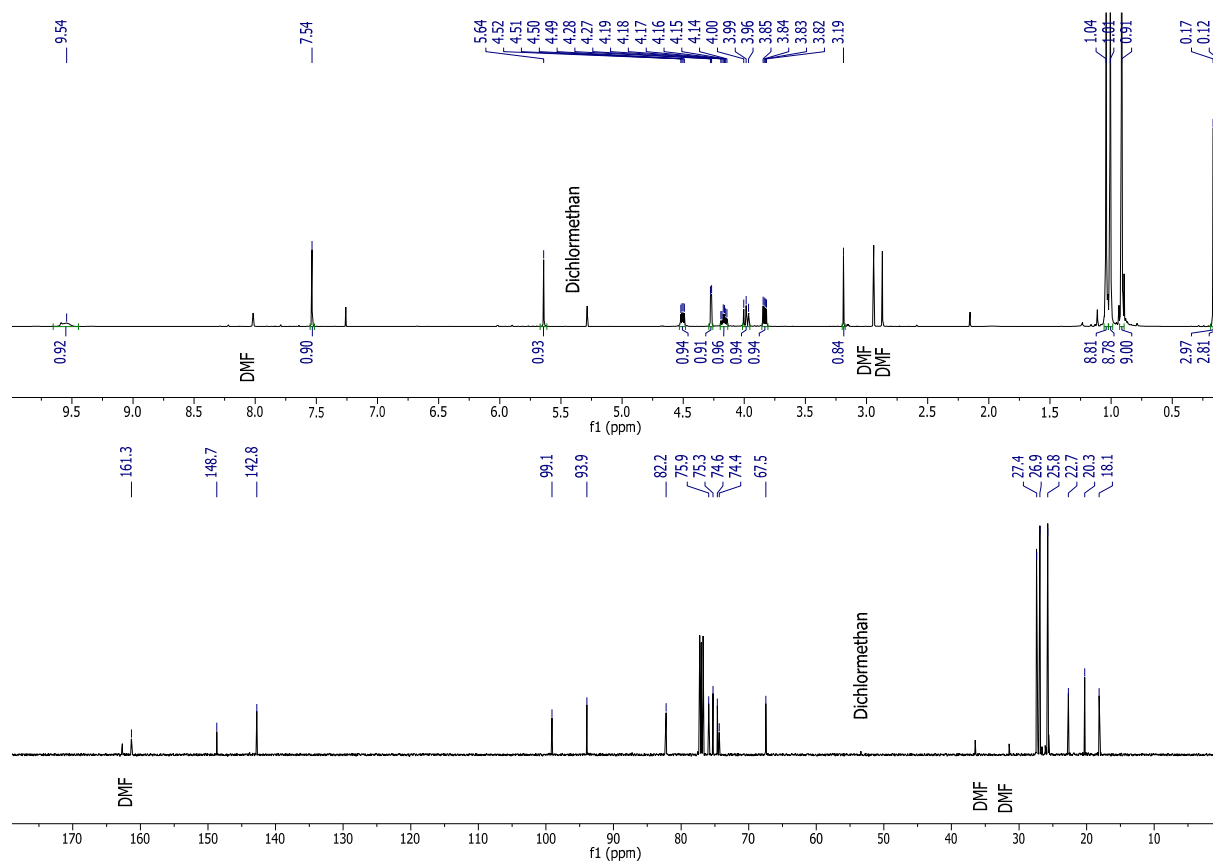


1,3-Di-*N*-tert-butyloxycarbonyl-5,6-*O*-cyclohexyliden-4-*O*-propargyl-2-desoxystreptamin 41 (CD₃OD)**1,3-Di-*N*-tert-butyloxycarbonyl-5,6-*O*-cyclohexyliden-4-*O*-pentynyl-2-desoxystreptamin 44 (CD₃OD)**

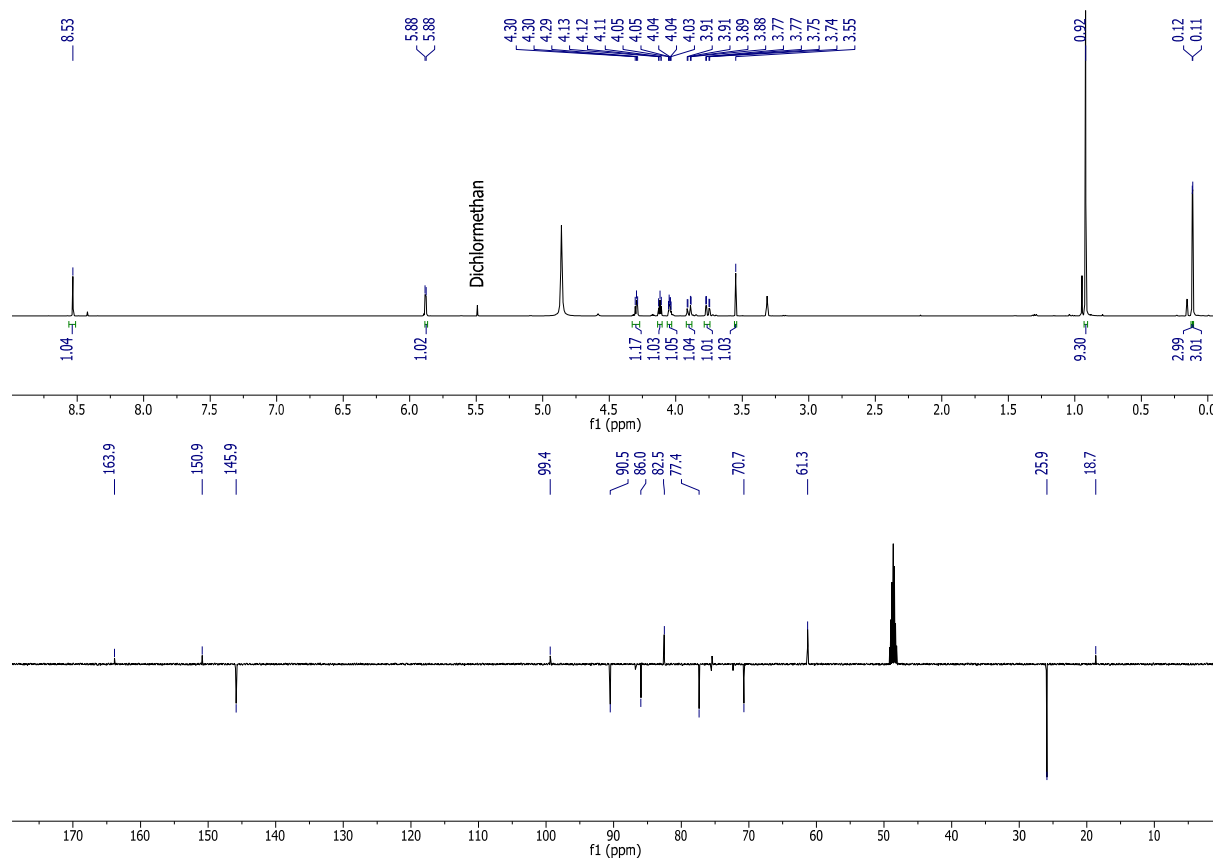
1,3,2',6'-Tetra-*N*-*tert*-Butyloxycarbonyl-5,6-*O*-cyclohexyliden-6'-*N*-propargylneamin 48 (CD₃CN)

6'-*N*-Propargylneamin 49 (D₂O)


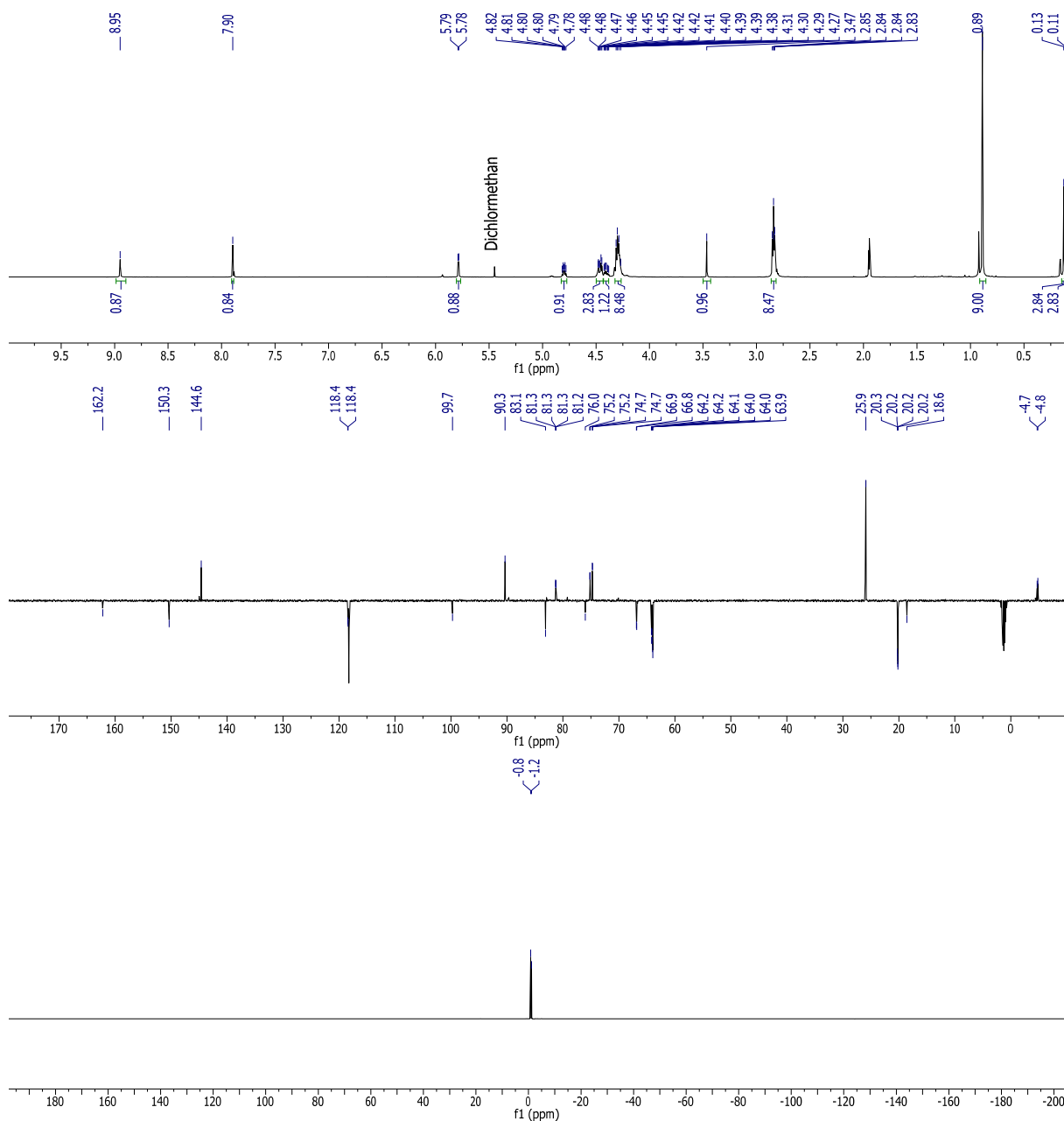
4,4'-Diazido-*p*-terphenyl A18 (DMSO)**Allenylisches Phosphonat 79 (CDCl₃)**

2'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3',5'-*O*-bis(*tert*-butyl)silyl-5-ethynyluridin 69 (CDCl₃)

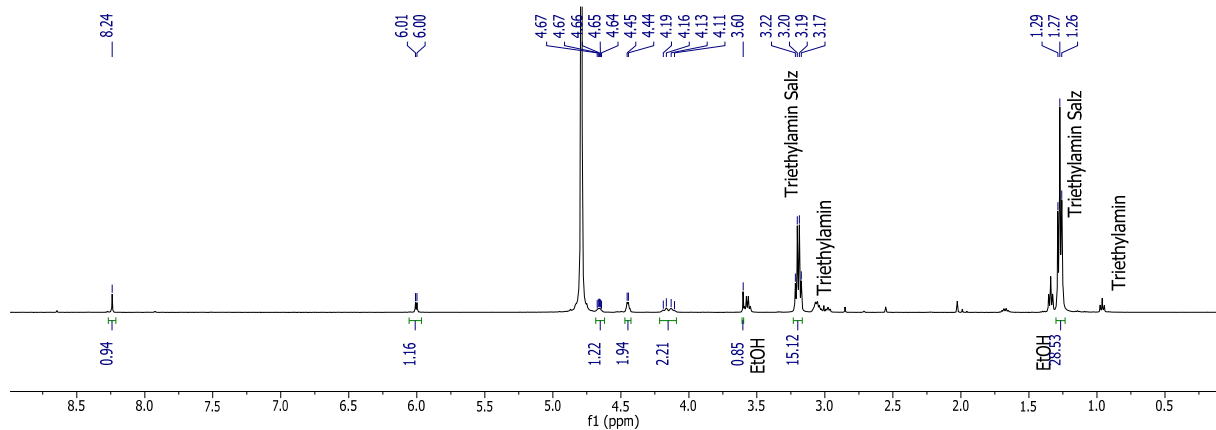


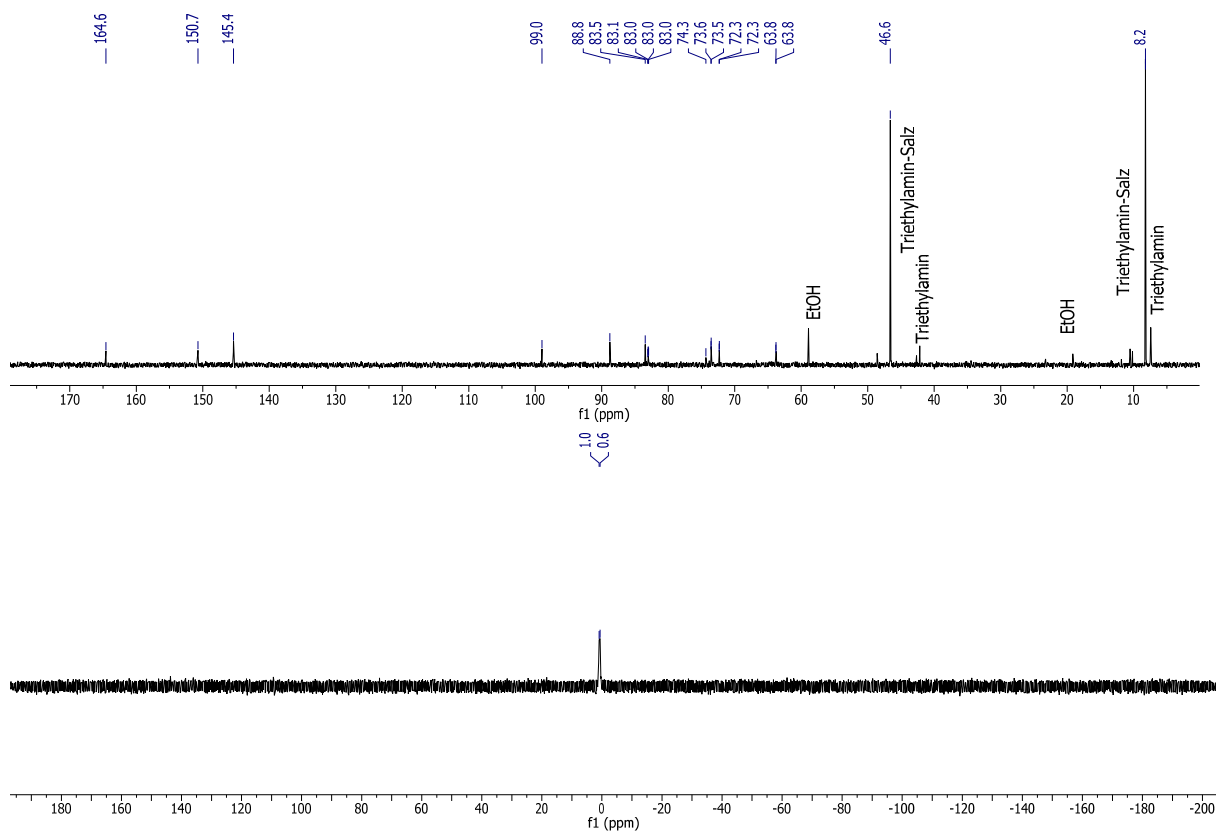
2'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-5-ethynyluridin 70 (CD₃OD)



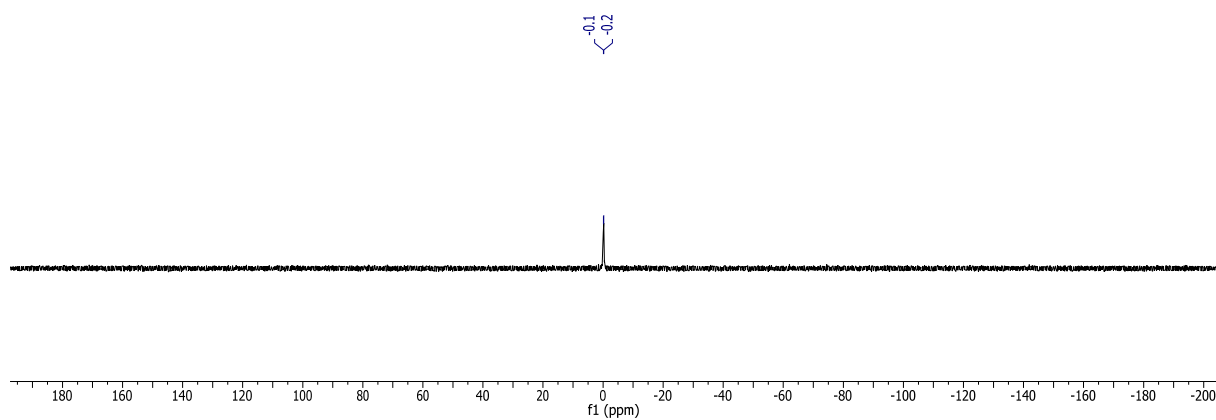
2'-*O*-*tert*-Butyldimethylsilyl-3',5'-*O*,*O*-bis[di(2-cyanoethyl)]phosphoryl-5-ethynyl-uridin 71 (CD₃CN)

162

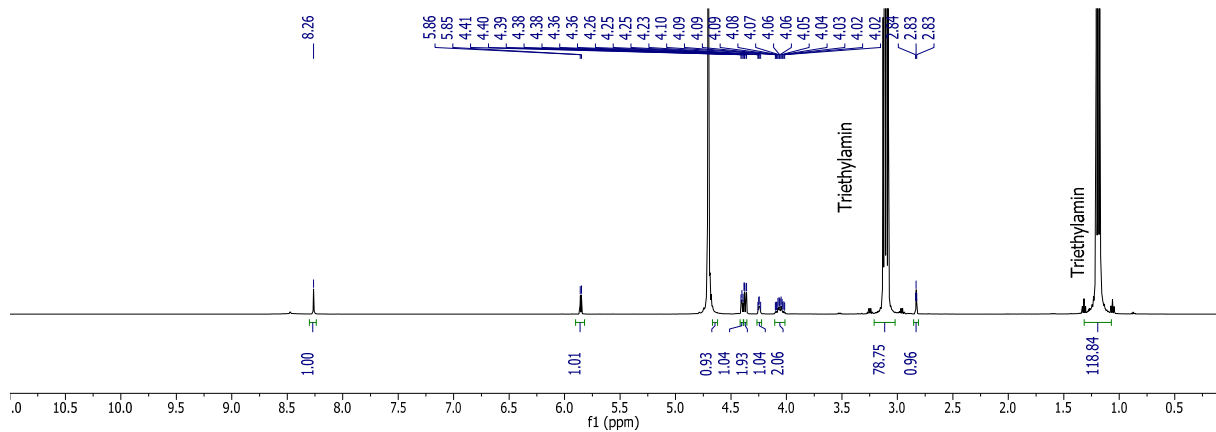
3',5'-*O*,*O*-Bisphosphat-5-ethynyluridin 72 pUp^{Alk} (D₂O)



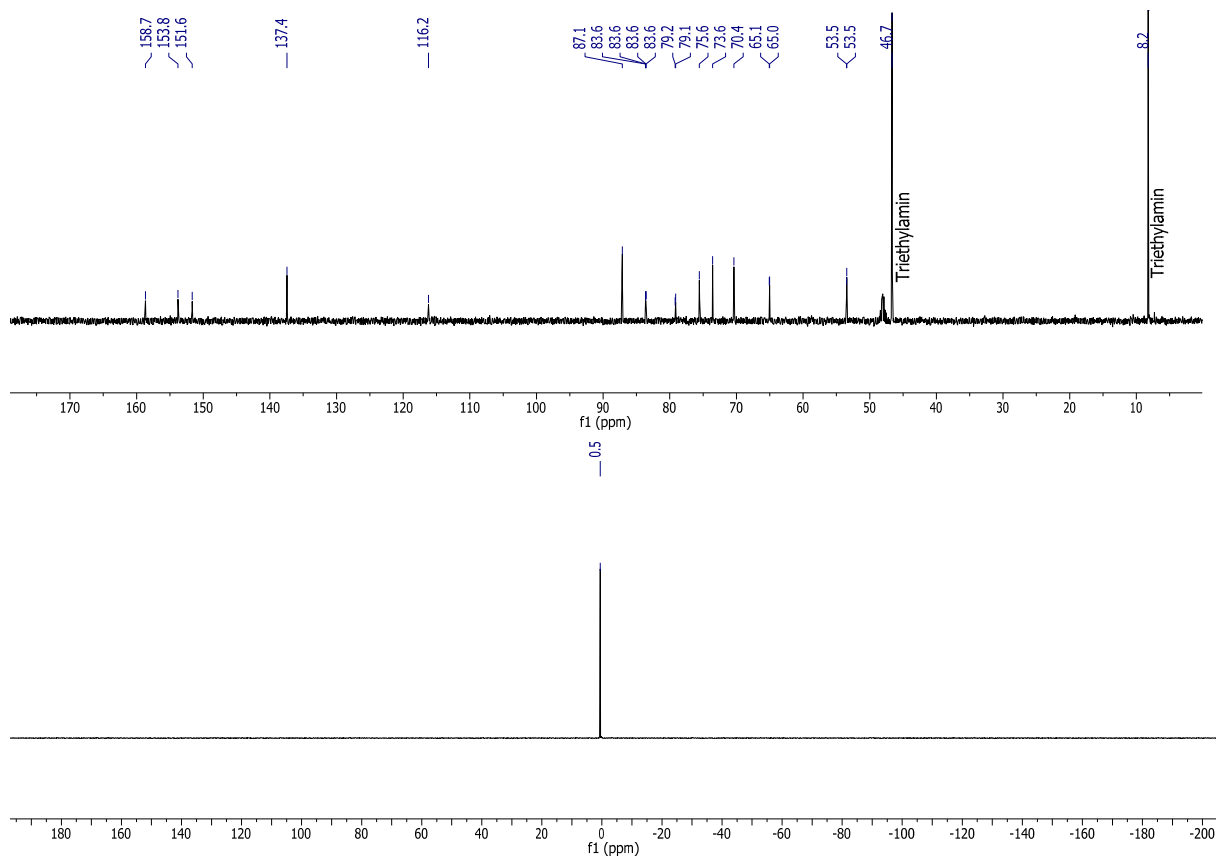
FAM-markiertes 3',5'-O,O-Bisphosphatluridin pUp^{FAM} 76 (DMSO)



O-(5'-Guanosin)-O-propargylmonophosphat 84 (GMP^{PrG}) (D₂O)

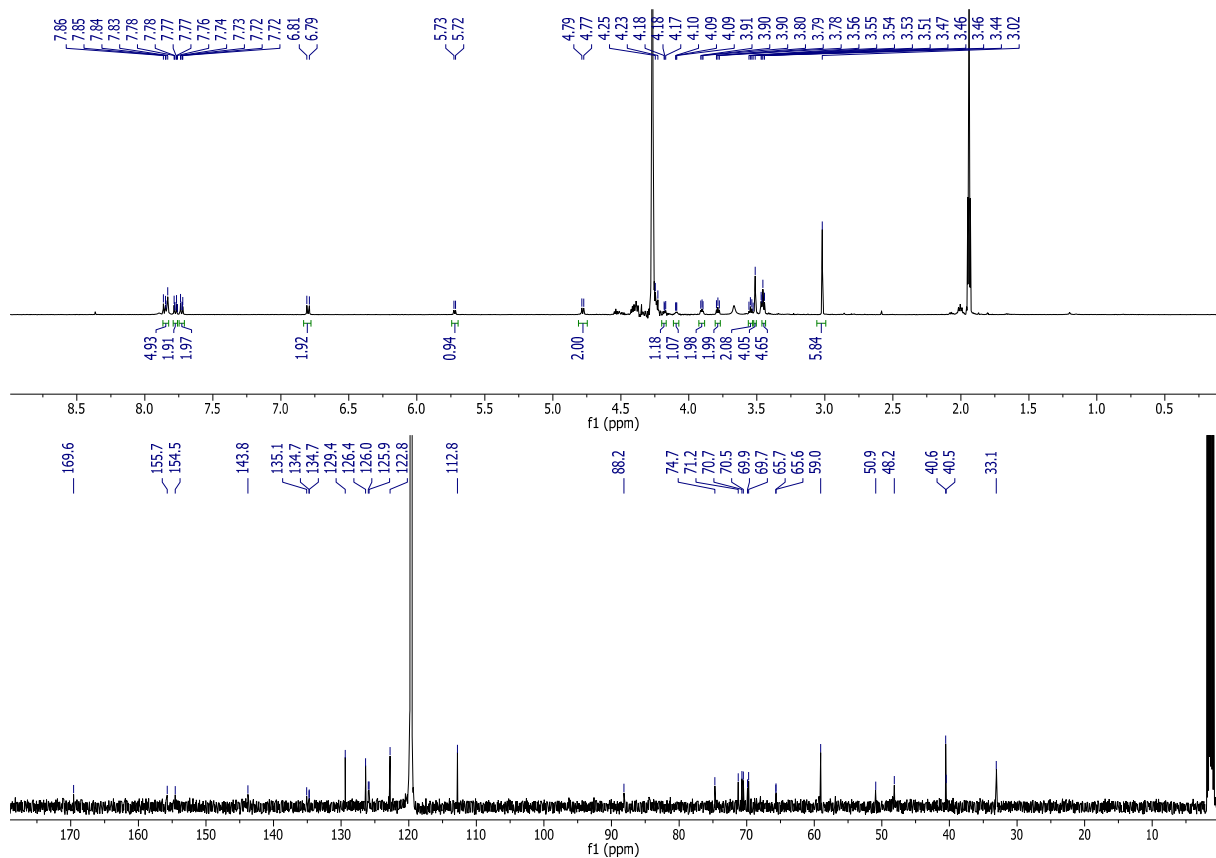


7-1 | NMR-Spektren

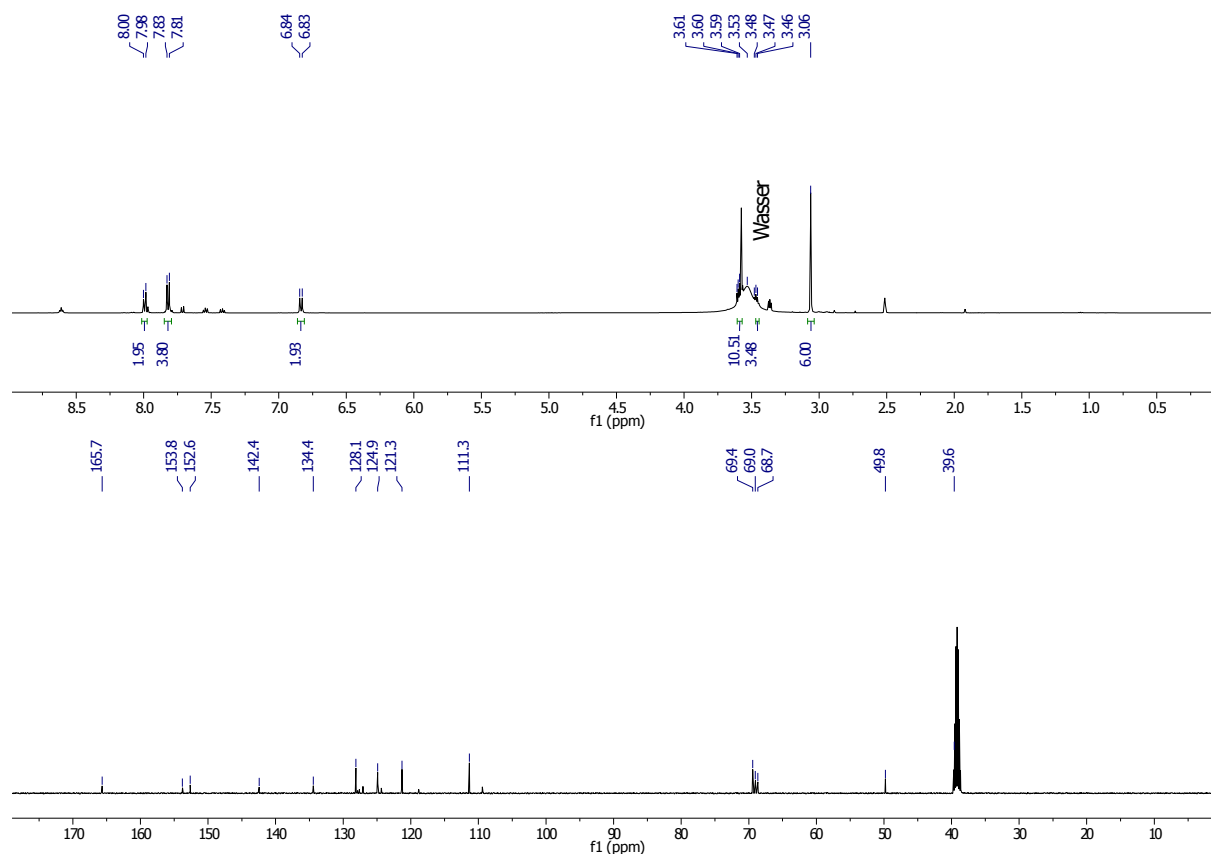


DAB-markiertes Guanosinmonophosphat 86 (GMP^{DAB}) (CD₃CN)

164



N-([2-(2-Aminoethoxy)ethoxy]ethanazid)-4-(4-dimethylaminophenylazo)benzamid 85

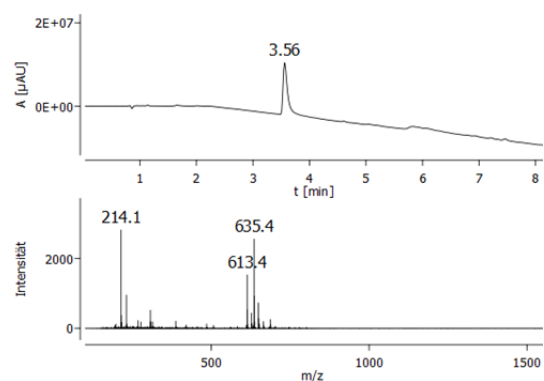


165

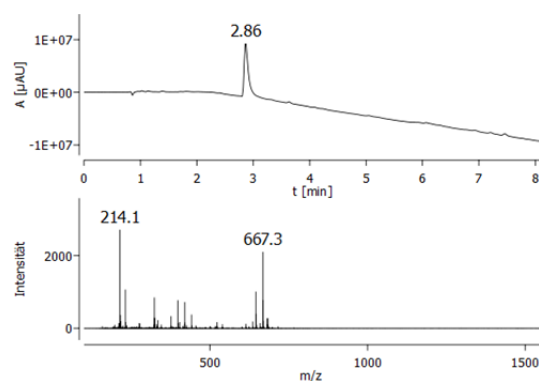
7-2 | UPLC/UV-Vis/MS-Analyse der Substanzbibliothek-Mitglieder

Alle analytischen UPLC-Trennungen der Substanzbibliothek-Mitglieder wurden von Dr. Joachim Leistner ausgeführt. Um verlässliche Aussagen über die Reinheit zu bekommen, wurden die Chromatogramme über den gesamten Absorptionsbereich des PDA-Detektors (200 - 800 nm) aufgenommen. Die gefundenen m/z -Verhältnisse dienen nur zum Nachweis der Produktidentität. Zusätzlich wurde von Dipl.-Chem. Jan Falkenhagen eine ESI-HRMS-Analyse für alle Mitglieder der Substanzbibliothek durchgeführt.

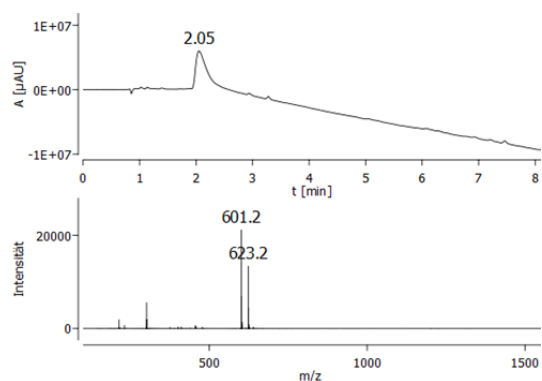
D A1 $[\text{M}+\text{H}]^+ = 613.7$ | $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 635.7$



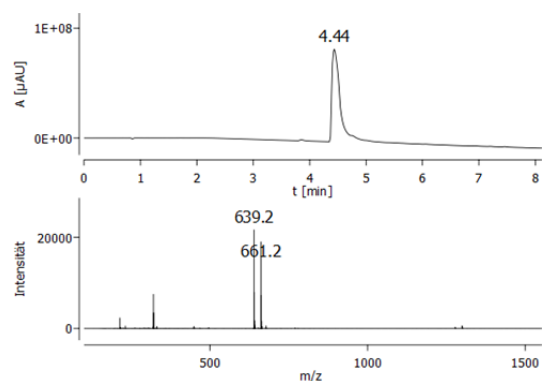
D A2 $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 667.7$



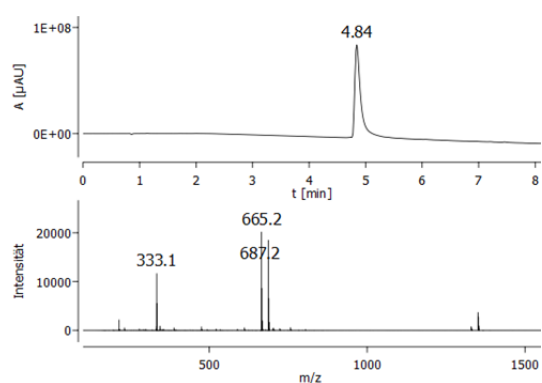
D A3 [M+H]⁺ = 601.7 | [M+Na]⁺ = 623.7



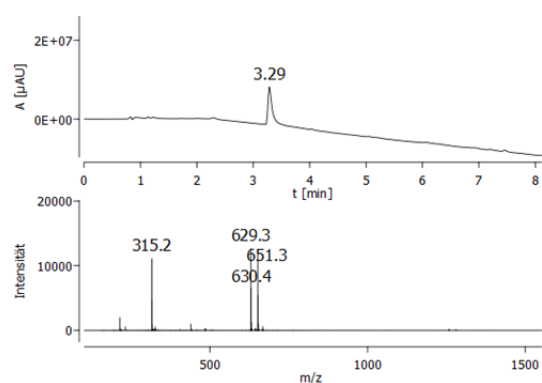
D A4 [M+H]⁺ = 639.7 | [M+Na]⁺ = 661.7



D A5 [M+H]⁺ = 665.8 | [M+Na]⁺ = 687.8

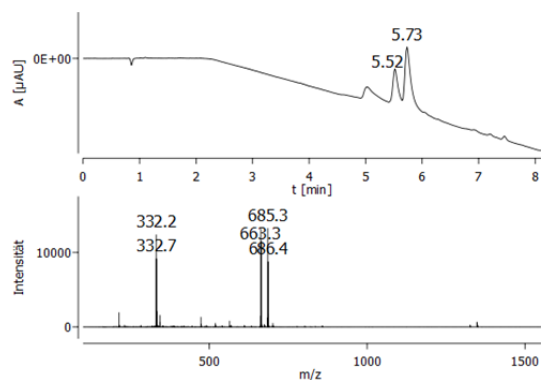


D A6 [M+H]⁺ = 629.7 | [M+Na]⁺ = 651.7

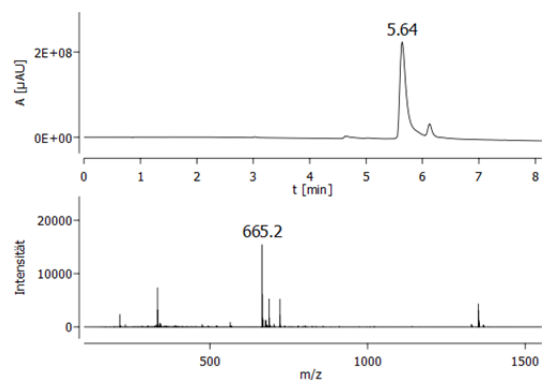


166

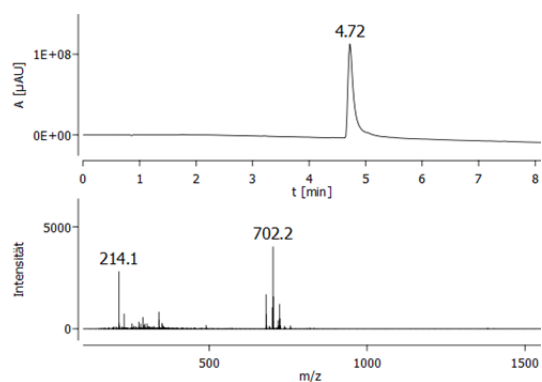
D A7 [M+H]⁺ = 663.8 | [M+Na]⁺ = 685.8



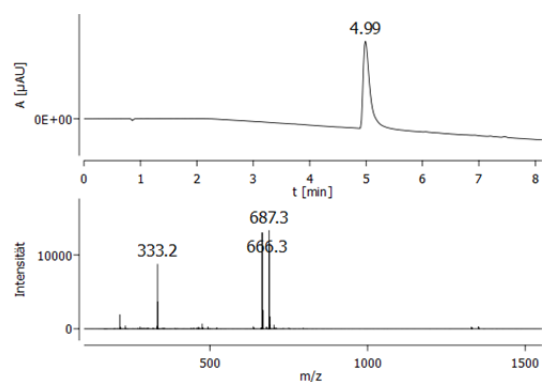
D A8 [M+H]⁺ = 665.7

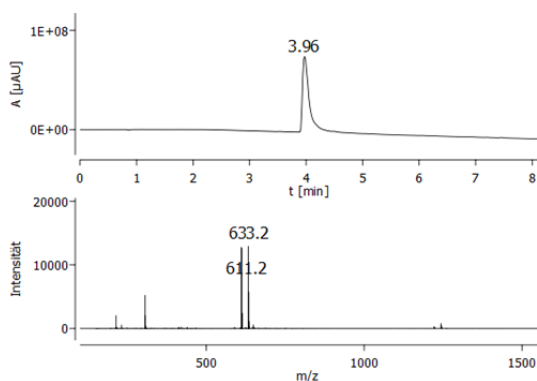
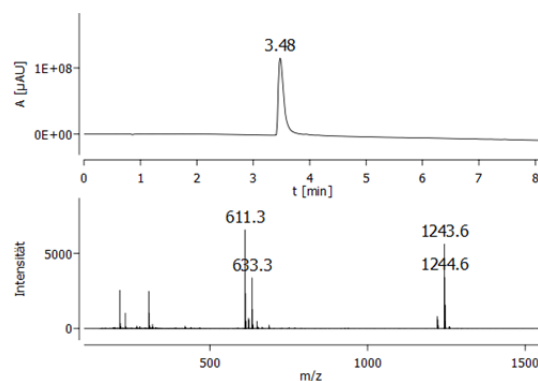
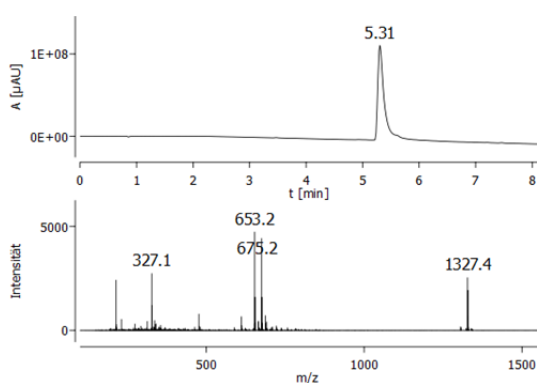
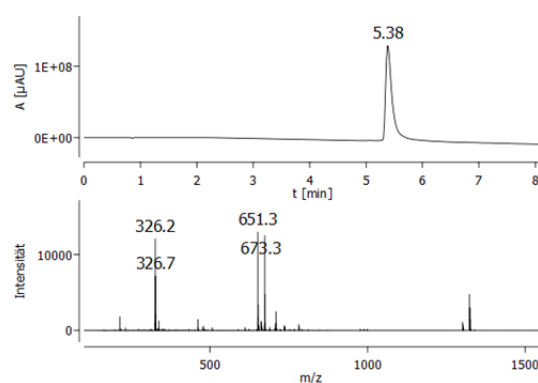
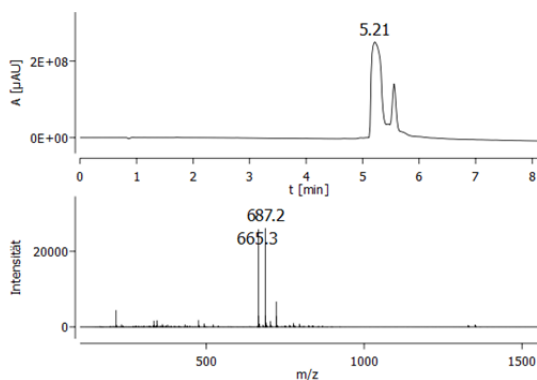
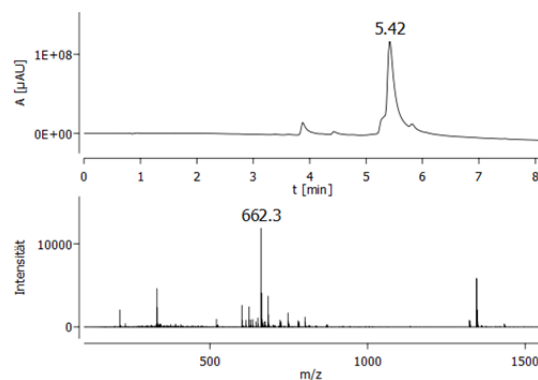
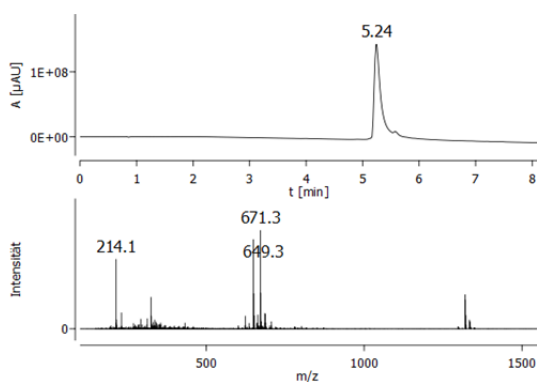
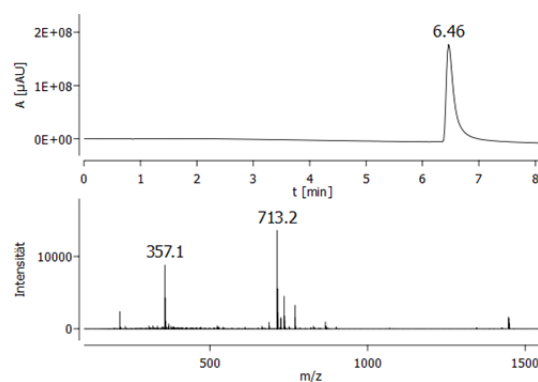


D A9 [M+Na]⁺ = 702.7

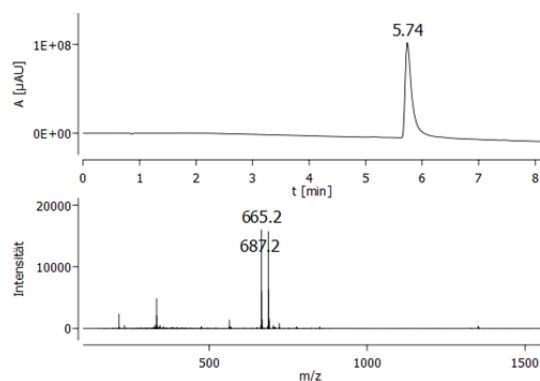


D A10 [M+H]⁺ = 665.8 | [M+Na]⁺ = 687.8

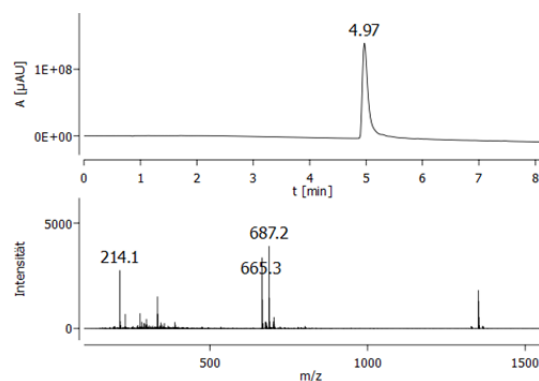


D A11 $[M+H]^+ = 611.7$ | $[M+Na]^+ = 633.7$ **D A12 $[M+H]^+ = 611.7$ | $[M+Na]^+ = 633.7$** **D A13 $[M+H]^+ = 653.7$ | $[M+Na]^+ = 675.7$** **D A14 $[M+H]^+ = 651.3$ | $[M+Na]^+ = 673.3$** **D A15 $[M+H]^+ = 665.7$ | $[M+Na]^+ = 687.7$** **D A16 $[M+H]^+ = 662.7$** **D A17 $[M+H]^+ = 649.7$ | $[M+Na]^+ = 671.7$** **D A18 $[M+H]^+ = 713.8$** 

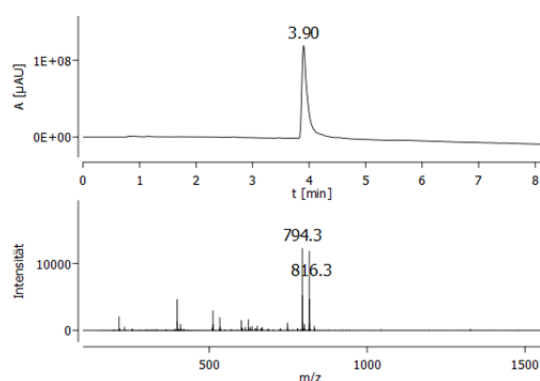
D A19 [M+H]⁺ = 665.8 | [M+Na]⁺ = 687.8



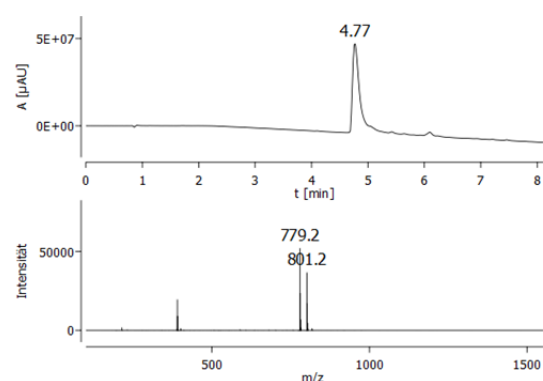
D A20 [M+H]⁺ = 665.8 | [M+Na]⁺ = 687.8



D A21 [M+H]⁺ = 794.9 | [M+Na]⁺ = 816.8

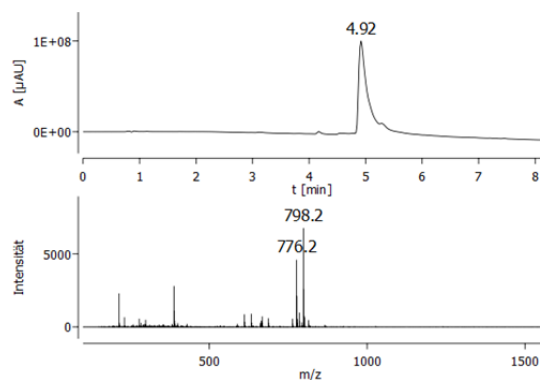


D A22 [M+H]⁺ = 779.9 | [M+Na]⁺ = 801.9

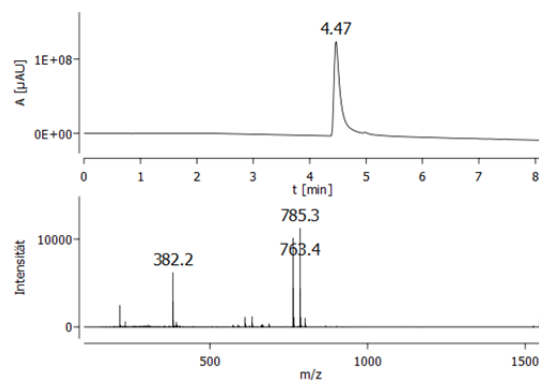


168

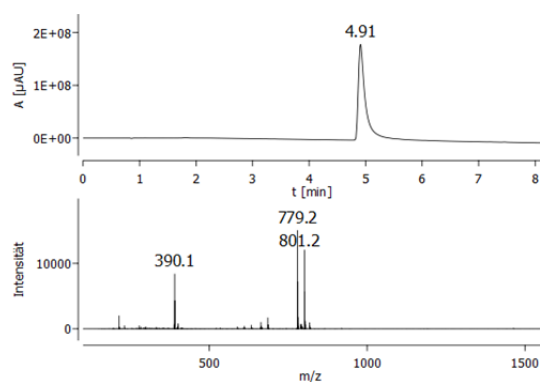
D A23 [M+H]⁺ = 776.8 | [M+Na]⁺ = 798.8



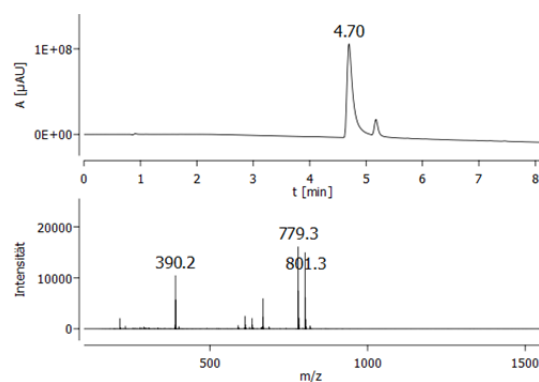
D A24 [M+H]⁺ = 763.8 | [M+Na]⁺ = 785.8

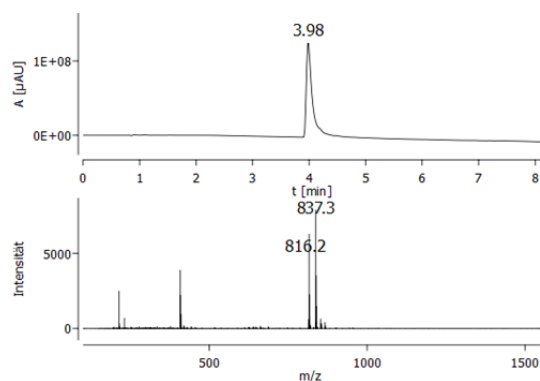
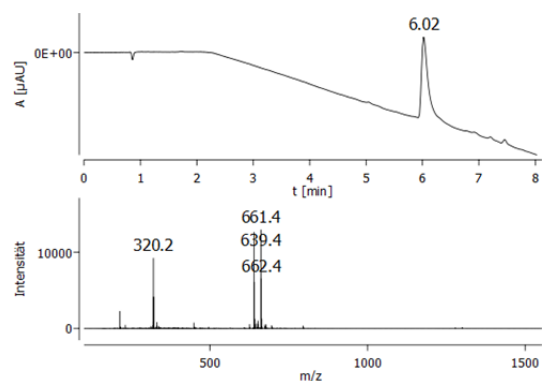
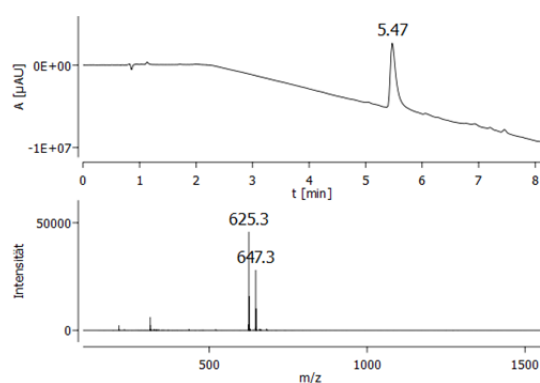
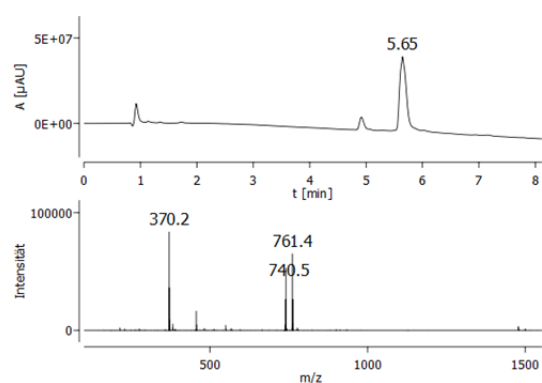
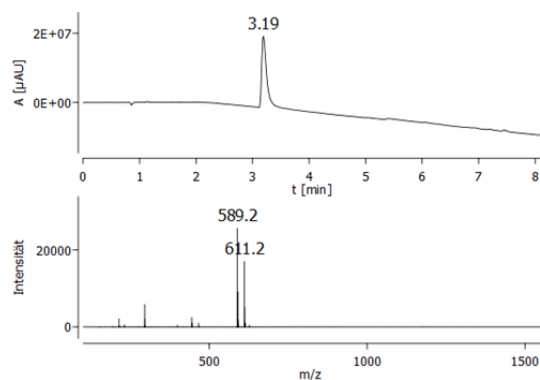
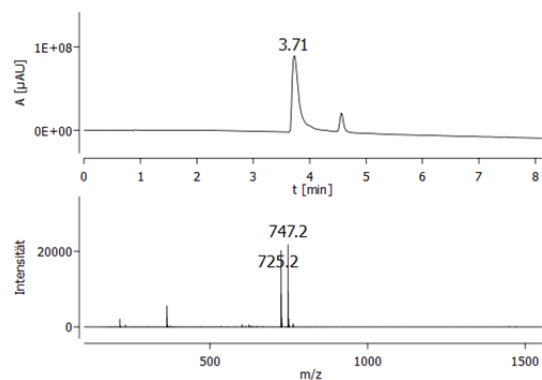
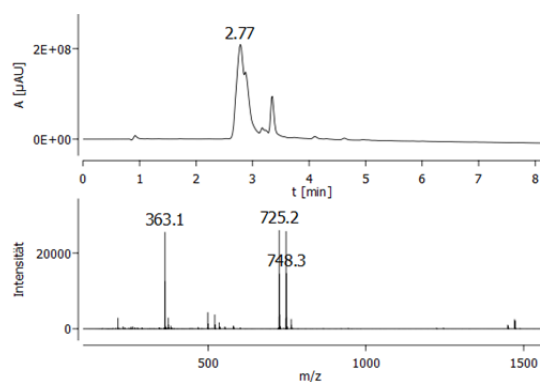
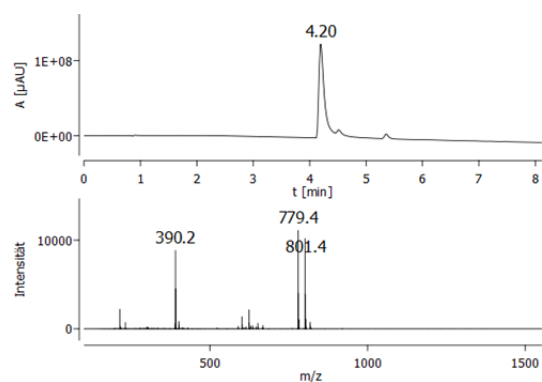


D A25 [M+H]⁺ = 779.8 | [M+Na]⁺ = 801.8

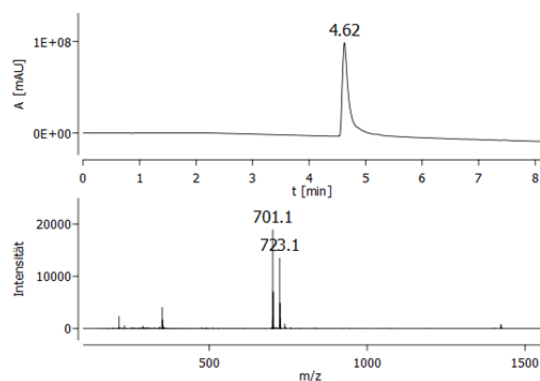


D A26 [M+H]⁺ = 779.8 | [M+Na]⁺ = 801.8

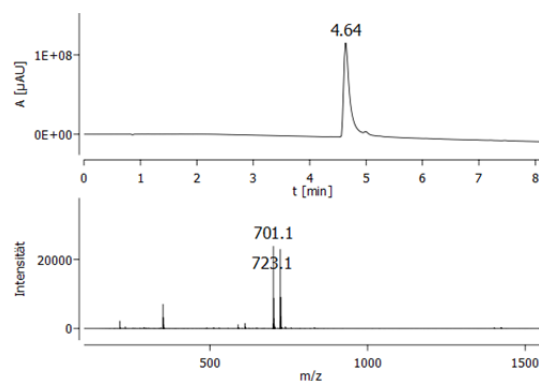


D A27 $[M+H]^+ = 815.9$ | $[M+Na]^+ = 837.9$ **D A28 $[M+H]^+ = 639.8$ | $[M+Na]^+ = 661.8$** **D A29 $[M+H]^+ = 625.8$ | $[M+Na]^+ = 647.8$** **D A30 $[M+H]^+ = 739.9$ | $[M+Na]^+ = 761.9$** **D A31 $[M+H]^+ = 589.7$ | $[M+Na]^+ = 611.7$** **D A32 $[M+H]^+ = 725.8$ | $[M+Na]^+ = 747.8$** **D A33 $[M+H]^+ = 725.8$ | $[M+Na]^+ = 747.8$** **D A34 $[M+H]^+ = 779.9$ | $[M+Na]^+ = 801.9$** 

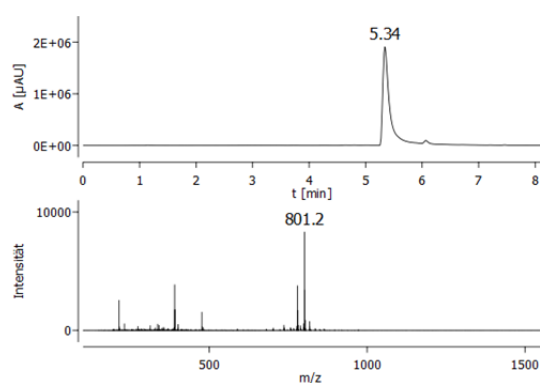
D A35 $[M+H]^+ = 701.8$ | $[M+Na]^+ = 723.8$



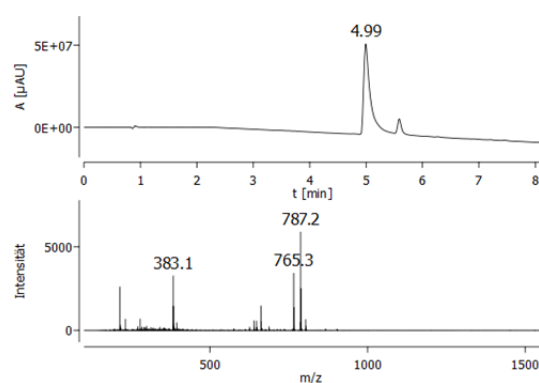
D A36 $[M+H]^+ = 701.8$ | $[M+Na]^+ = 723.8$



D A37 $[M+Na]^+ = 801.9$

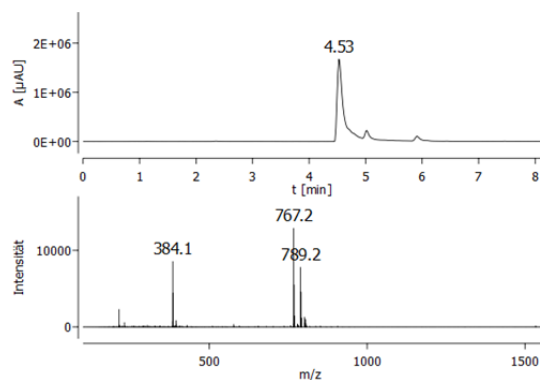


D A38 $[M+H]^+ = 765.9$ | $[M+Na]^+ = 787.8$

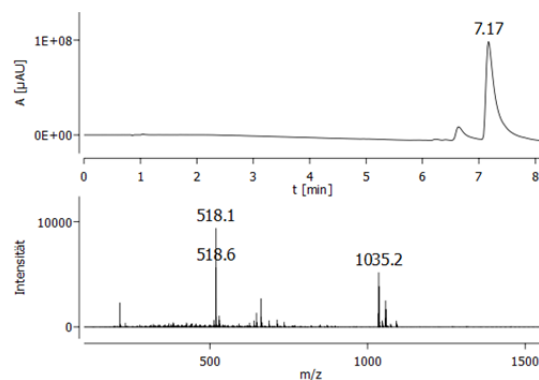


170

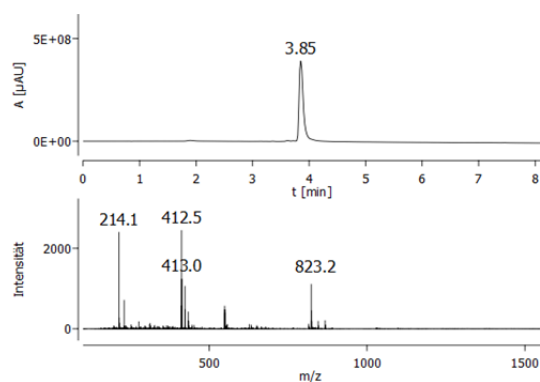
D A39 $[M+H]^+ = 767.8$ | $[M+Na]^+ = 789.8$



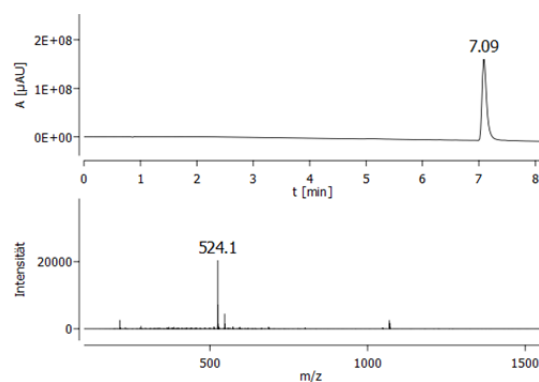
D A40 $[M+H]^+ = 1036.1$

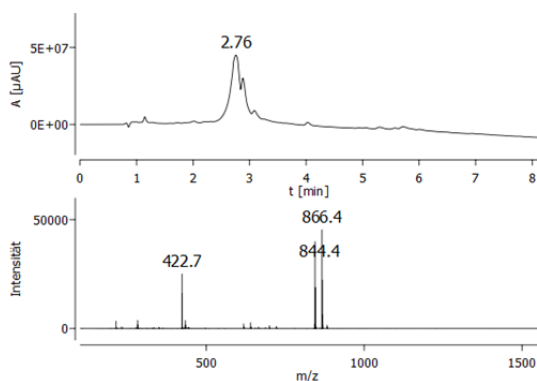
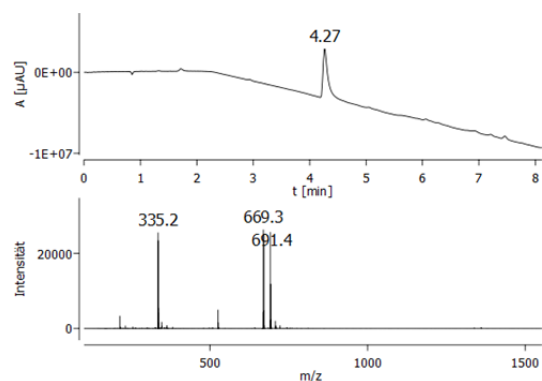
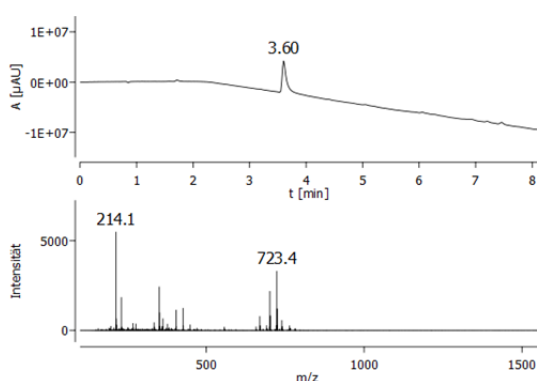
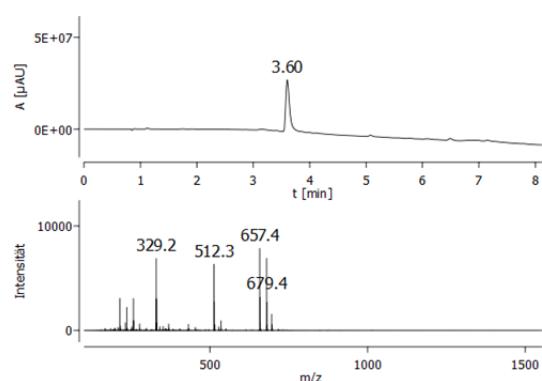
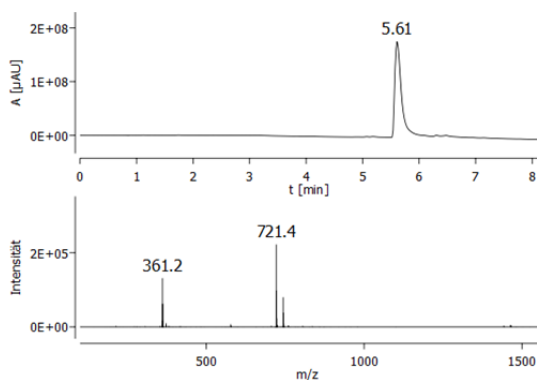
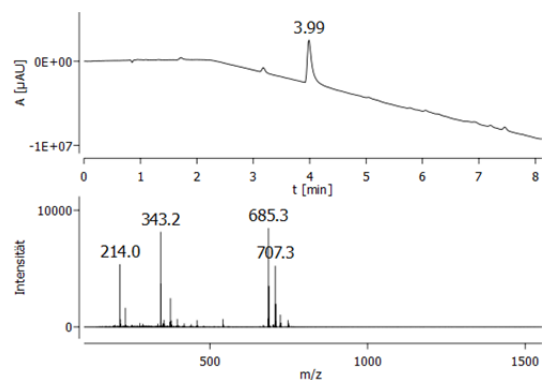
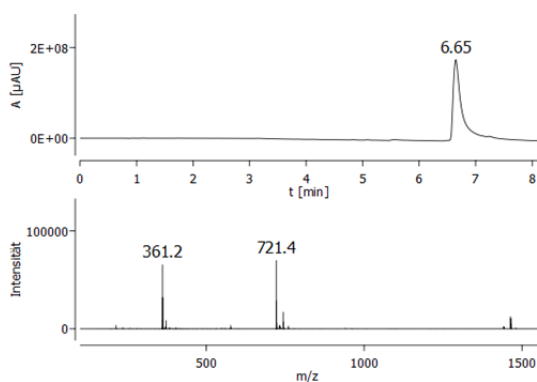
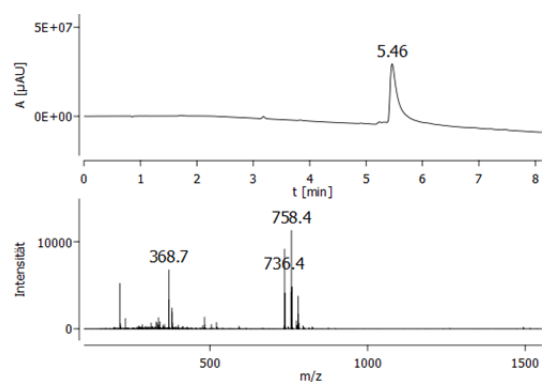


D A41 $[M+H]^+ = 823.9$

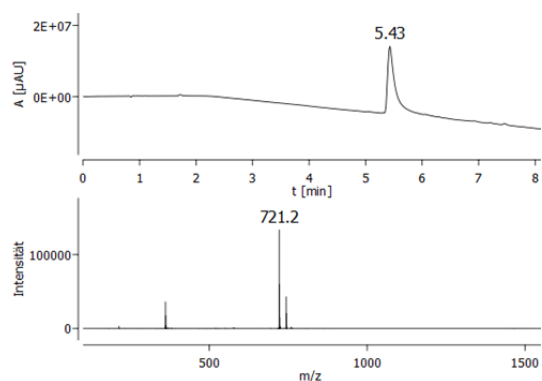


D A42 $[M+H]^+ = 524.6$ (Monomer)

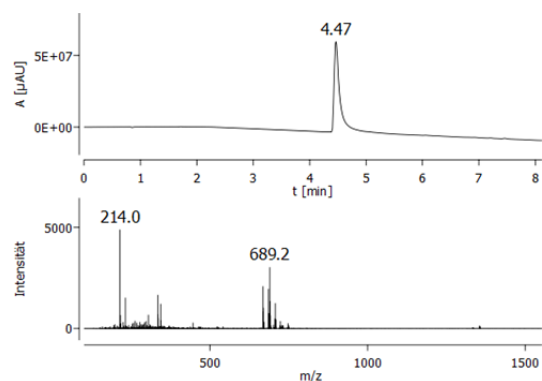


D A43 $[M+H]^+ = 844.95$ | $[M+Na]^+ = 866.9$ (Trimer)**D* A1 $[M+H]^+ = 669.9$ | $[M+Na]^+ = 691.8$** **D* A2 $[M+Na]^+ = 723.8$** **D* A3 $[M+H]^+ = 657.8$ | $[M+Na]^+ = 679.8$** **D* A5 $[M+H]^+ = 721.9$** **D* A6 $[M+H]^+ = 685.9$ | $[M+Na]^+ = 707.8$** **D* A8 $[M+H]^+ = 721.8$** **D* A9 $[M+H]^+ = 736.9$ | $[M+Na]^+ = 758.8$** 

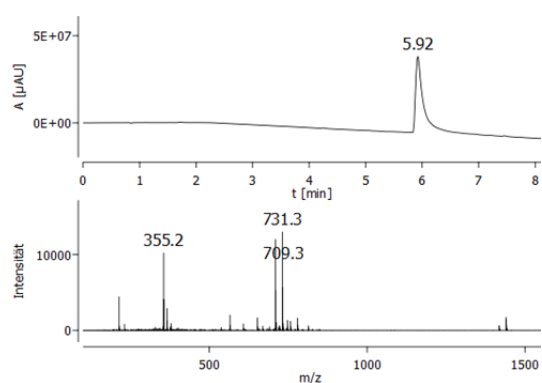
D* A10 [M+H]⁺ = 721.9



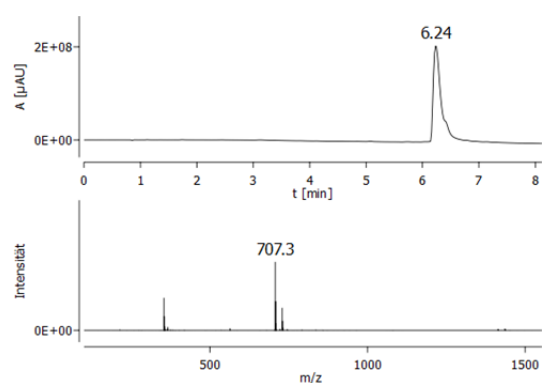
D* A12 [M+Na]⁺ = 689.8



D* A13 [M+H]⁺ = 709.8 | [M+Na]⁺ = 731.8

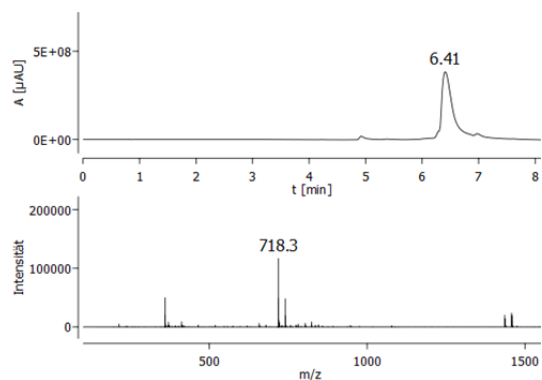


D* A14 [M+H]⁺ = 707.9

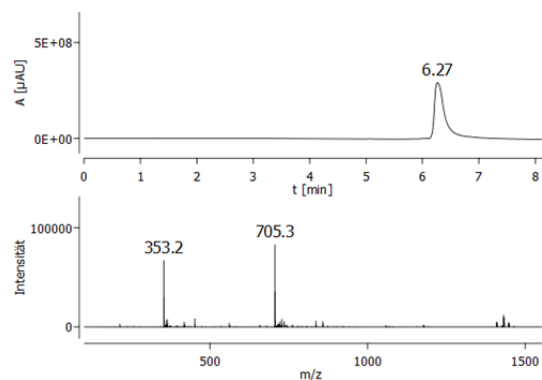


172

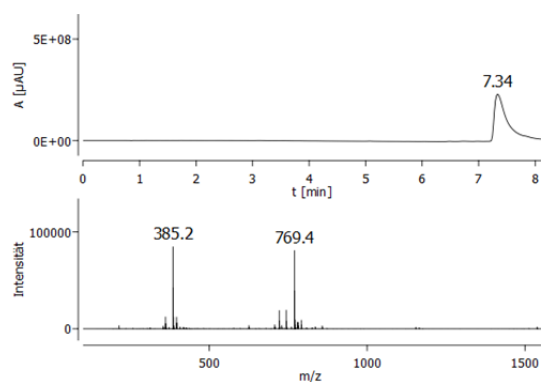
D* A16 [M+H]⁺ = 718.8



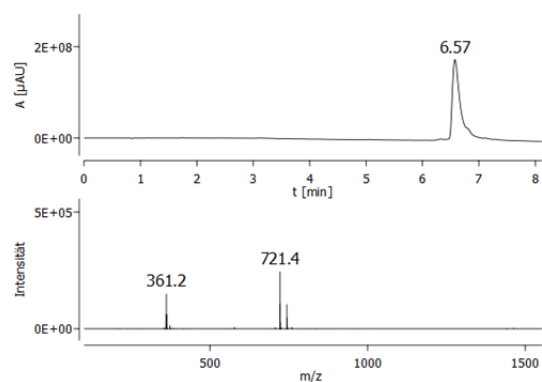
D* A17 [M+H]⁺ = 705.8

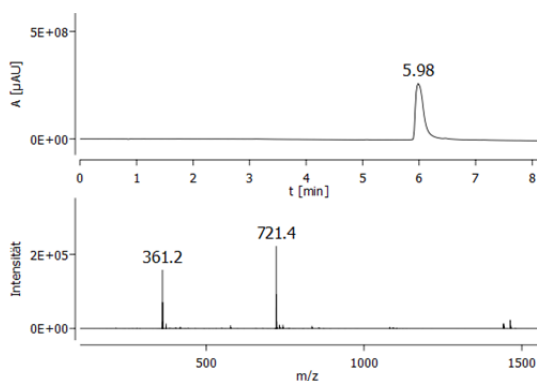
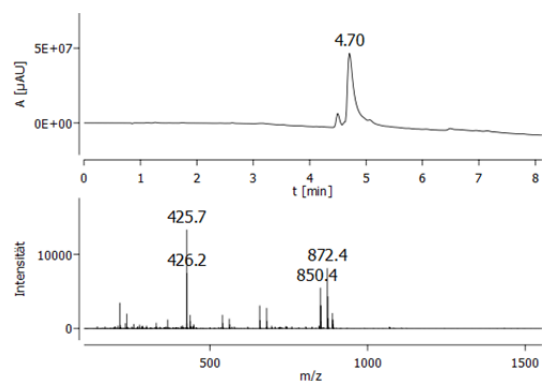
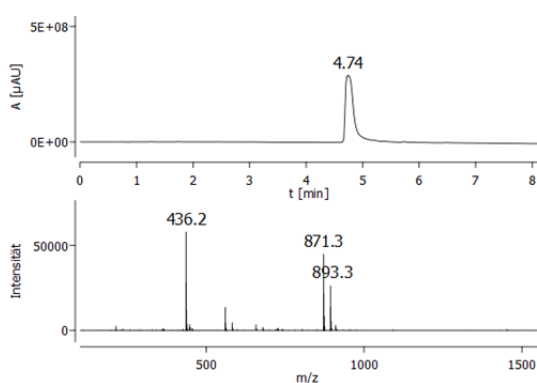
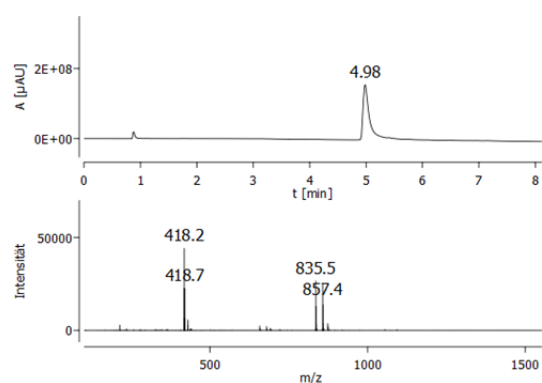
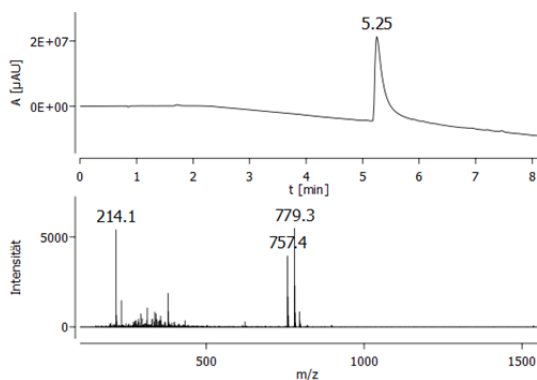
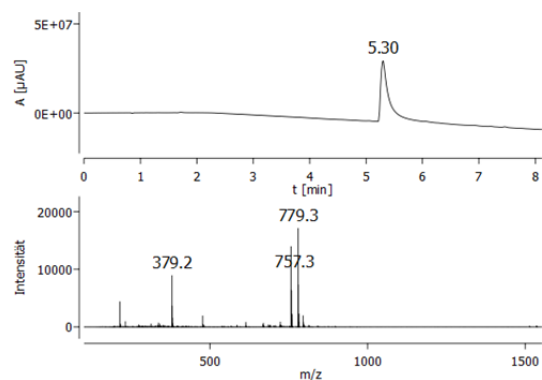
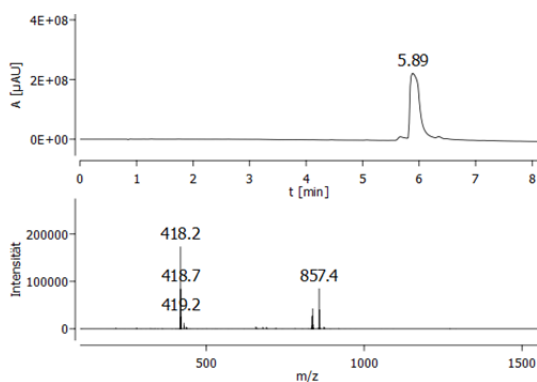
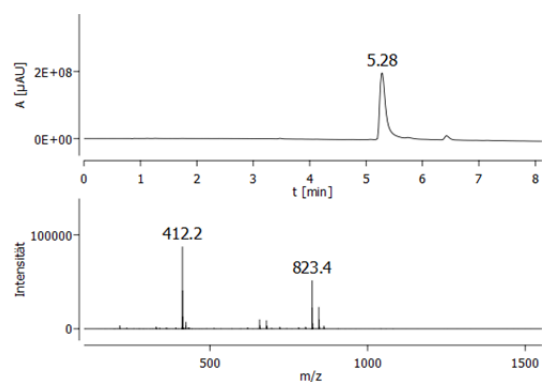


D* A18 [M+H]⁺ = 769.9

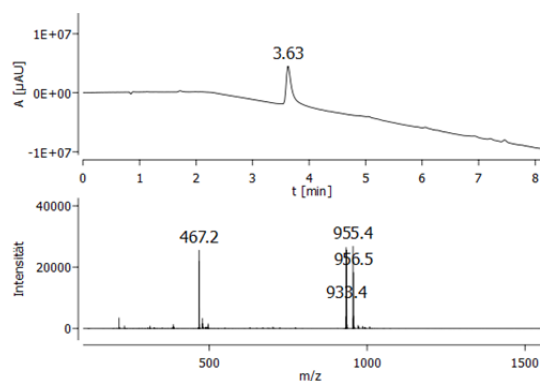


D* A19 [M+H]⁺ = 721.9

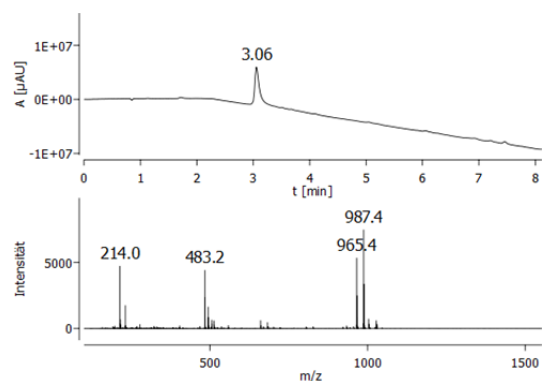


D* A20 $[M+H]^+ = 721.9$ **D* A21 $[M+H]^+ = 851.0$ | $[M+Na]^+ = 872.9$** **D* A27 $[M+H]^+ = 872.0$ | $[M+Na]^+ = 894.0$** **D* A34 $[M+H]^+ = 836.0$ | $[M+Na]^+ = 858.0$** **D* A35 $[M+H]^+ = 757.9$ | $[M+Na]^+ = 779.9$** **D* A36 $[M+H]^+ = 757.9$ | $[M+Na]^+ = 779.9$** **D* A37 $[M+Na]^+ = 858.0$** **D* A39 $[M+H]^+ = 823.9$** 

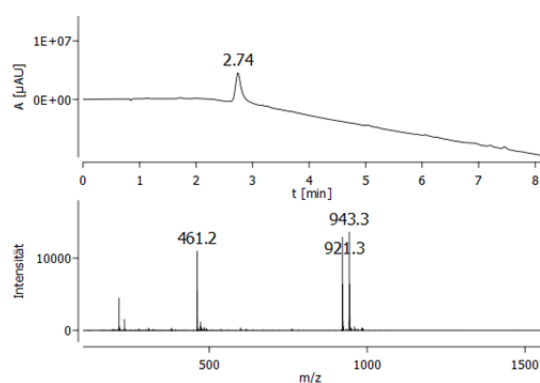
N A1 $[M+H]^+ = 934.1$ | $[M+Na]^+ = 956.1$



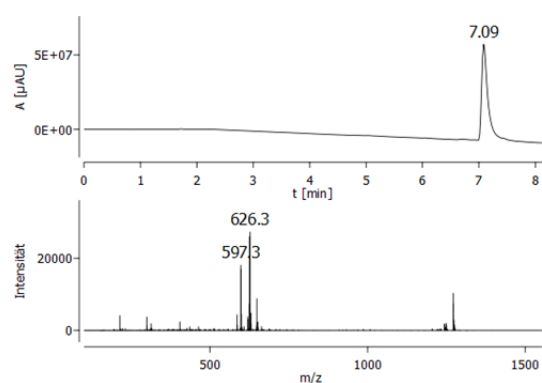
N A2 $[M+H]^+ = 966.1$ | $[M+Na]^+ = 988.1$



N A3 $[M+H]^+ = 922.0$ | $[M+Na]^+ = 944.0$

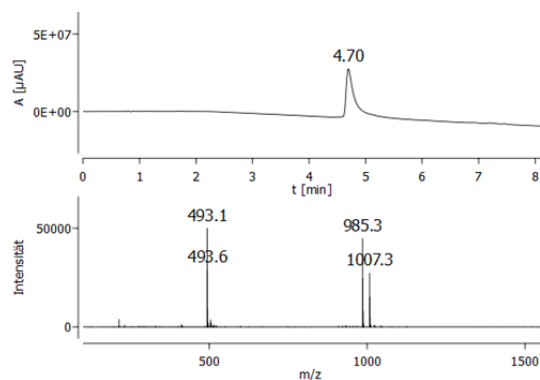


N A5 $[M+H]^+ = 625.7$ (Monomer)

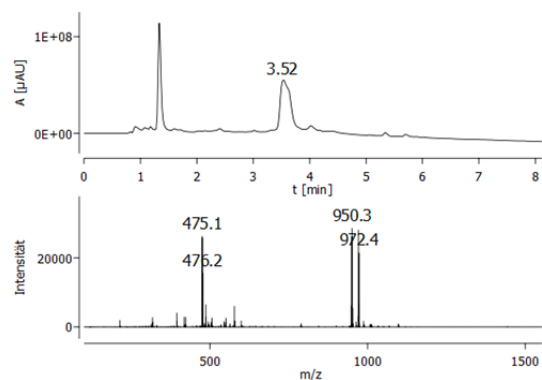


174

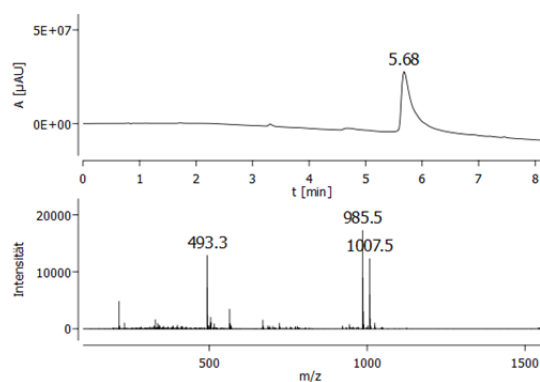
N A5 $[M+H]^+ = 986.1$ | $[M+Na]^+ = 1008.1$



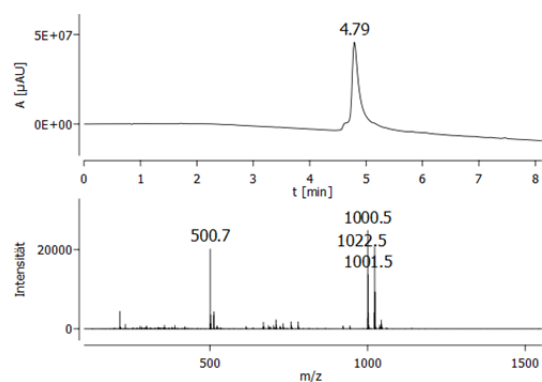
N A6 $[M+H]^+ = 950.1$ | $[M+Na]^+ = 972.1$

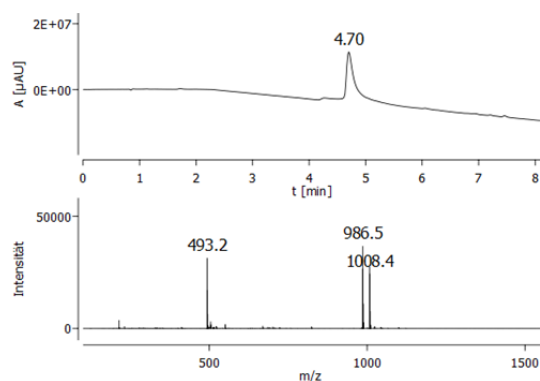
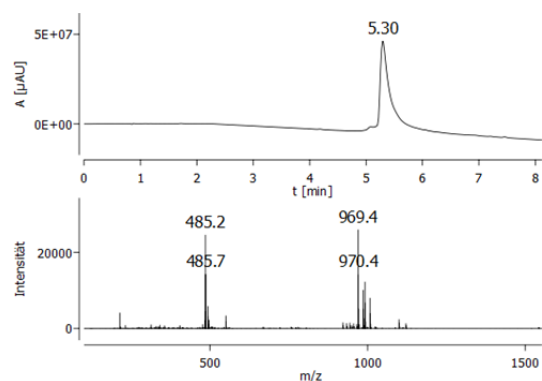
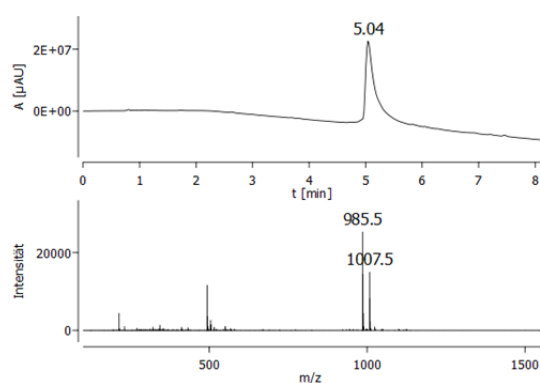
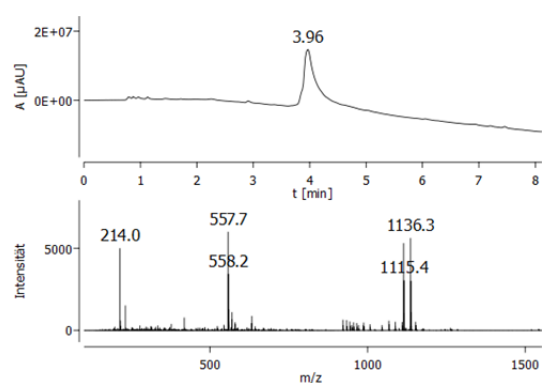
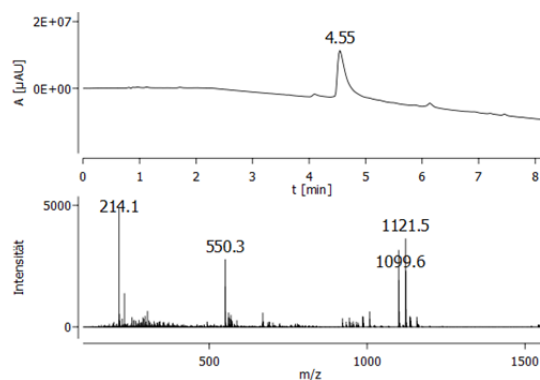
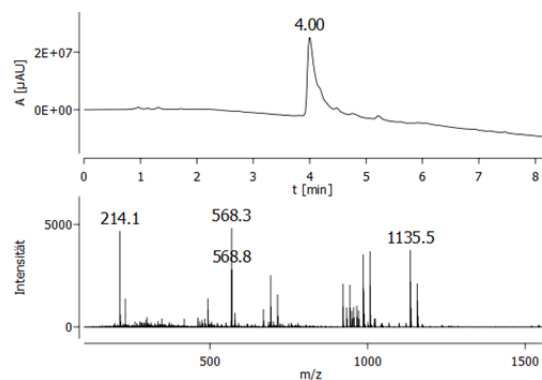
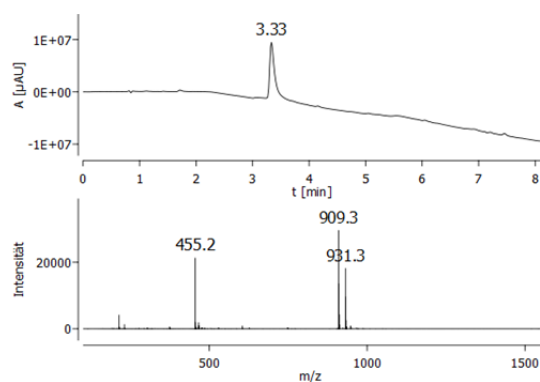
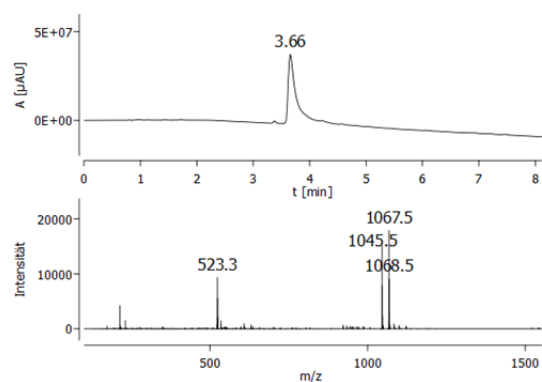


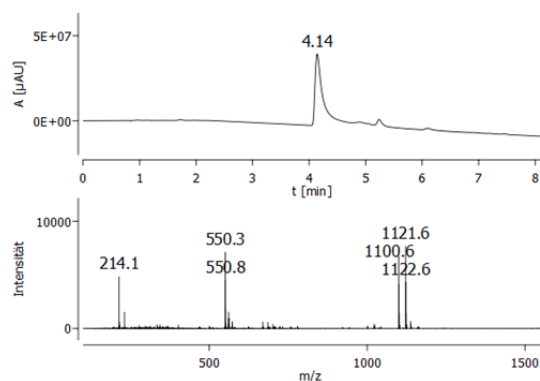
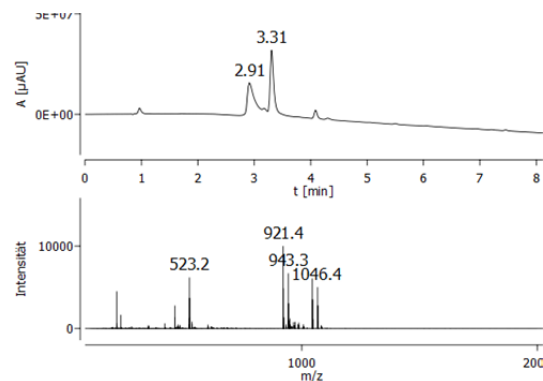
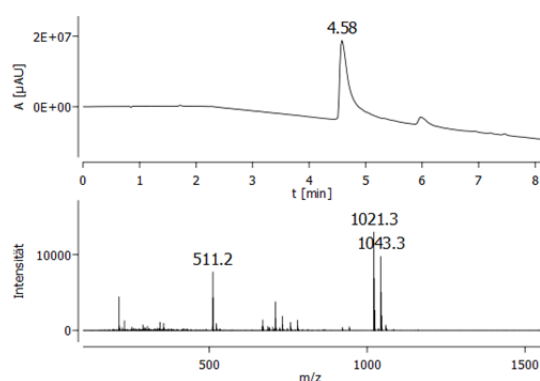
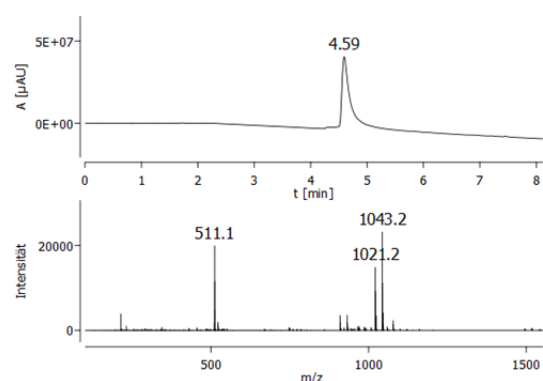
N A8 $[M+H]^+ = 986.1$ | $[M+Na]^+ = 1008.1$



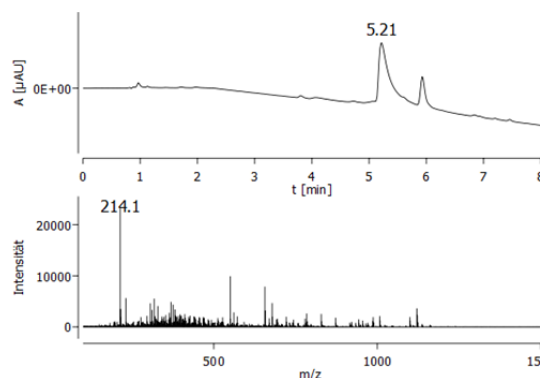
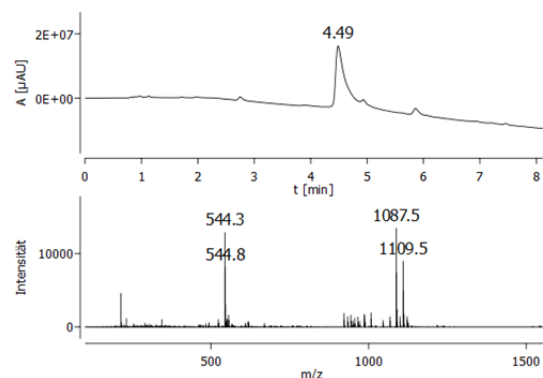
N A9 $[M+H]^+ = 1001.5$ | $[M+Na]^+ = 1023.1$



N A10 $[M+H]^+ = 986.1$ | $[M+Na]^+ = 1008.1$ **N A17 $[M+H]^+ = 970.1$** **N A20 $[M+H]^+ = 986.1$ | $[M+Na]^+ = 1008.1$** **N A21 $[M+H]^+ = 1115.2$ | $[M+Na]^+ = 1137.2$** **N A22 $[M+H]^+ = 1100.2$ | $[M+Na]^+ = 1122.2$** **N A27 $[M+H]^+ = 1136.2$** **N A31 $[M+H]^+ = 910.0$ | $[M+Na]^+ = 932.0$** **N A32 $[M+H]^+ = 1046.1$ | $[M+Na]^+ = 1068.1$** 

N A34 $[M+H]^+ = 1100.2$ | $[M+Na]^+ = 1122.2$ **N A33** $[M+H]^+ = 1046.1$ | $[M+Na]^+ = 1068.1$ **N A35** $[M+H]^+ = 1022.1$ | $[M+Na]^+ = 1044.4$ **N A36** $[M+H]^+ = 1022.1$ | $[M+Na]^+ = 1044.1$ 

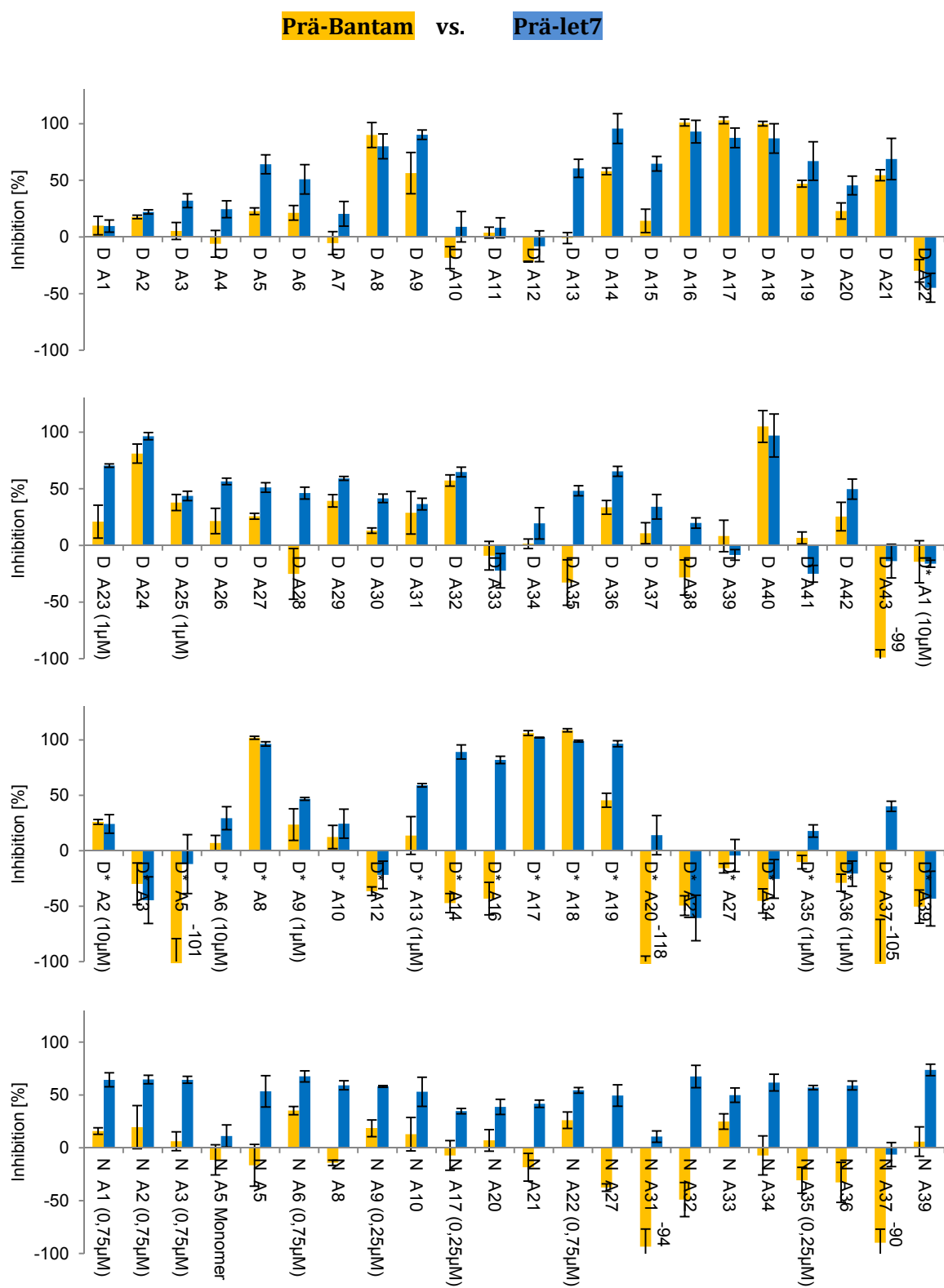
176

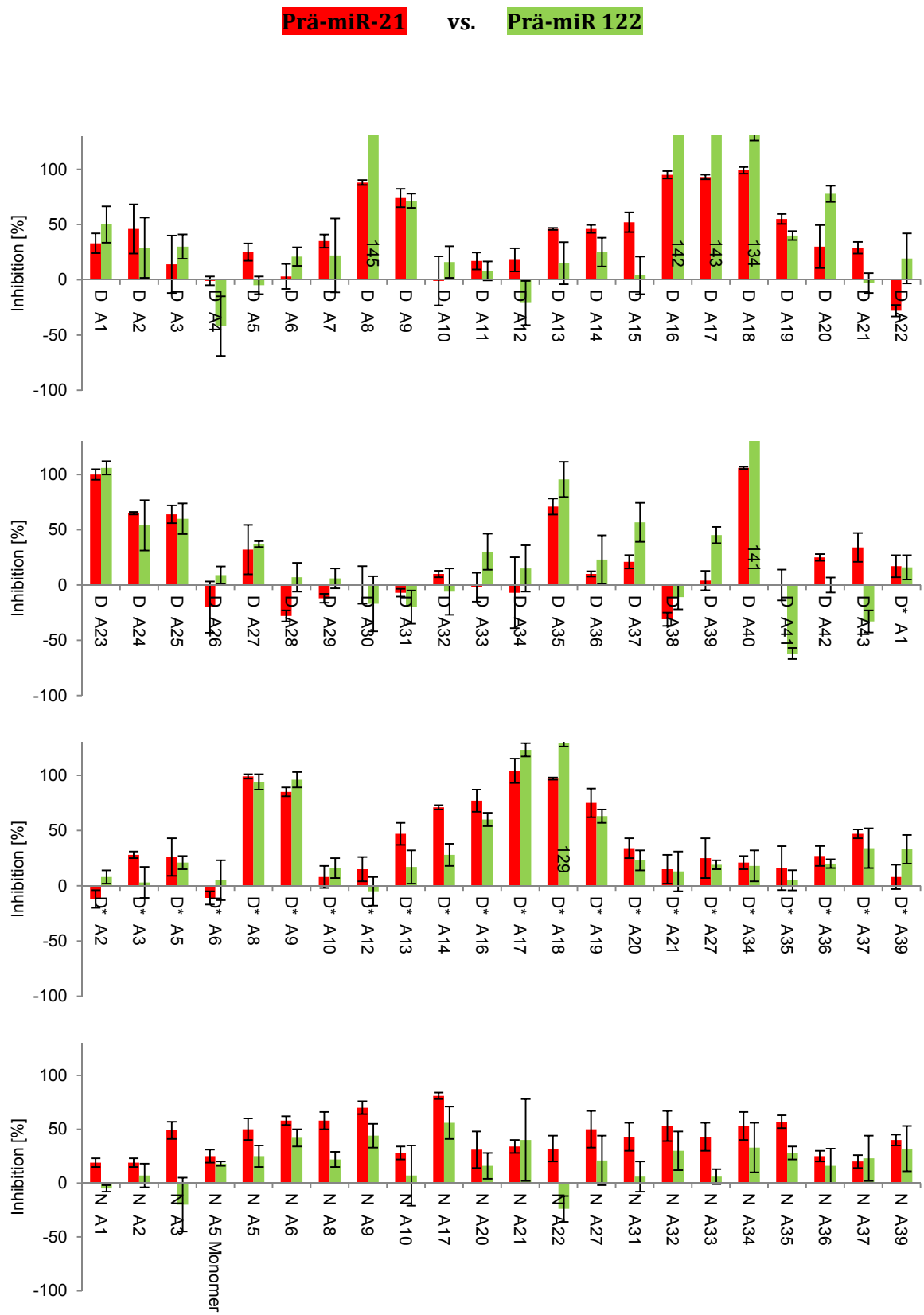
N A37 $[M+H]^+ = 1100.2$ | $[M+Na]^+ = 1122.2$ **N A39** $[M+H]^+ = 1088.2$ | $[M+Na]^+ = 1110.2$ 

7-3 | BRCA-Assay-Screening

7-3.1 | Initiales BRCA-Assay-Screening

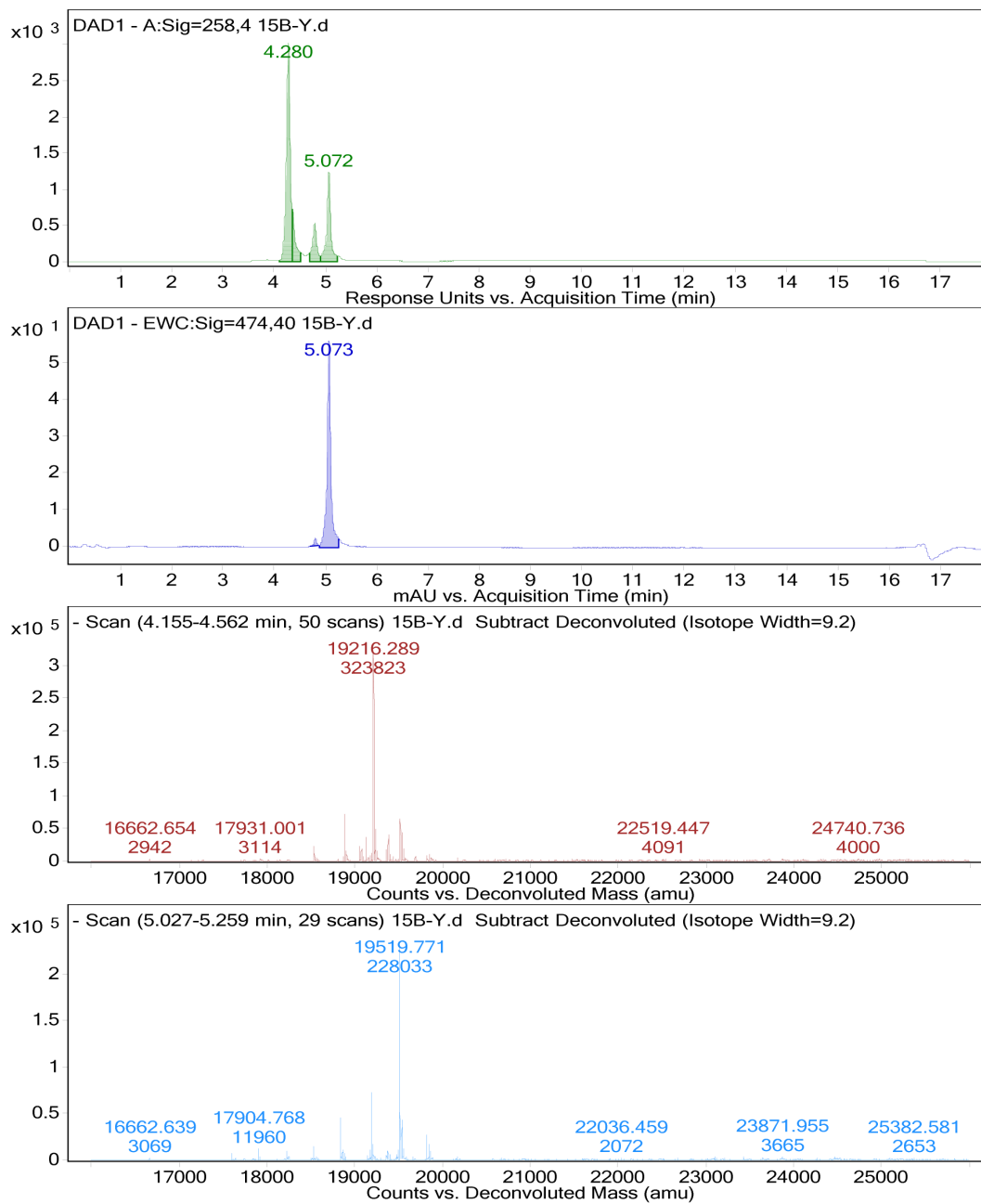
Alle D- und D*- Konjugate wurden im initialen BRCA-Screening bei 5 μM und N-Konjugate bei 0.5 μM vermessen, wenn nicht anders angegeben. Die Aminoglykoside Kanamycin A **KA**, Kanamycin B **KB**, Neomycin B **NB**, Streptomycin **STR**, Dihydrostreptomycin **DHS** wurden bei 50 μM , 2-Desoxystreptamin **14** sowie 4-O-Propargyl-2-desoxystreptamin **20** bei 5 μM und Neamin **21** sowie 6'-N-Propargylneamin **33** bei 0.5 μM getestet. Für Inhibitionswerte die außerhalb des Achsenbereichs liegen, ist zusätzlich der genaue Datenwert angegeben.





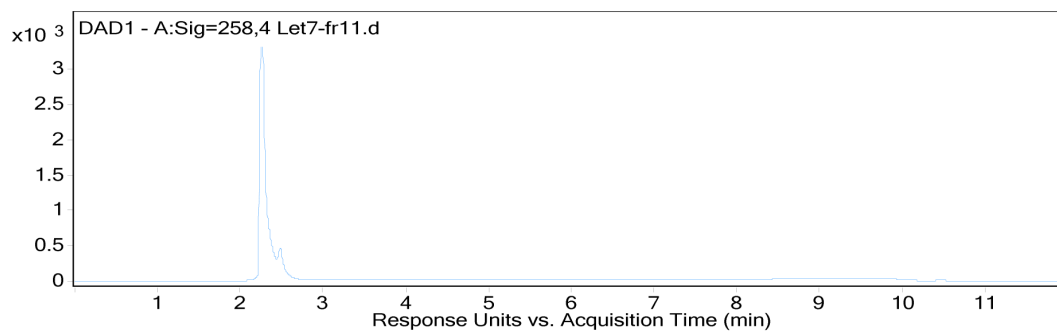
7-4 | UPLC/UV-Vis/MS-Chromatogramme von isolierten RNA-Oligomeren

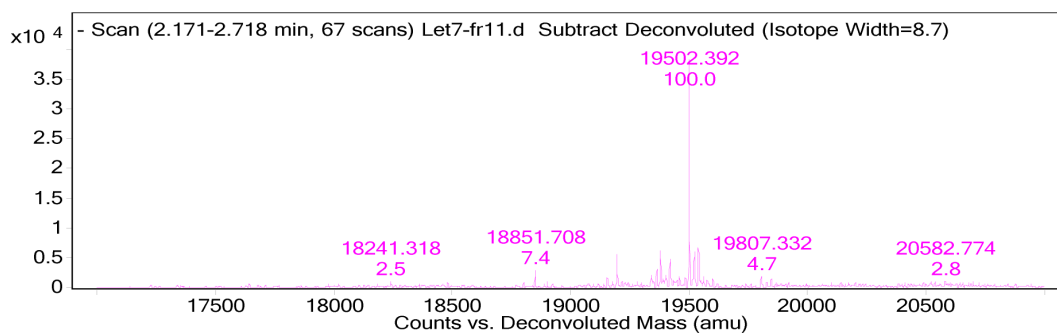
prä-miR-142 /^{DAB}prä-miR-142



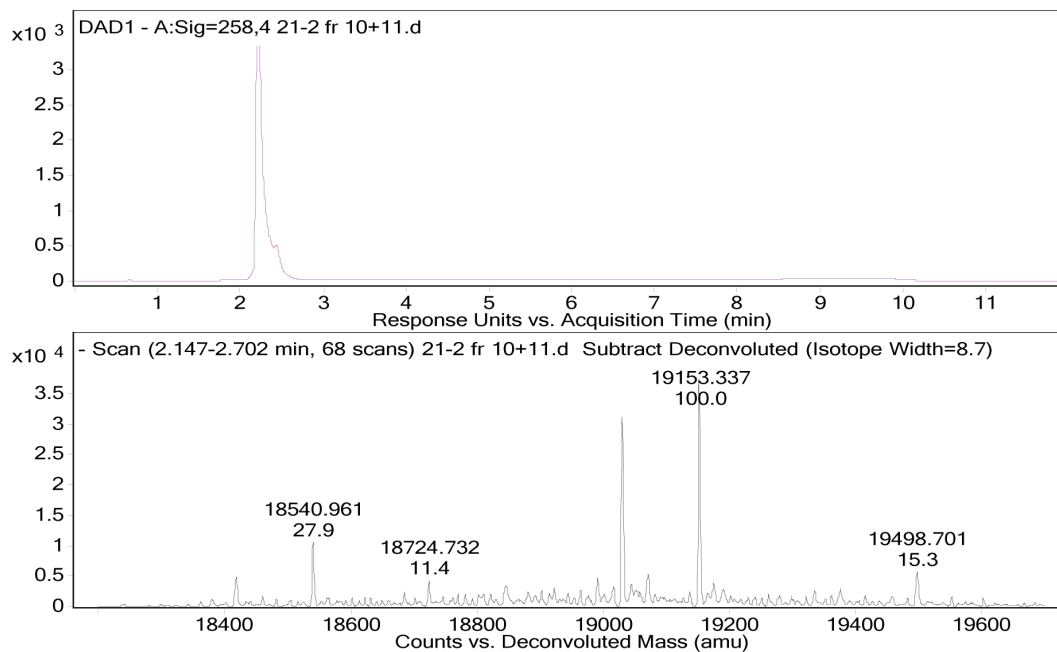
179

prä-let7 (Analyse der HPLC-Fraktion $t_R \sim 22$ min)

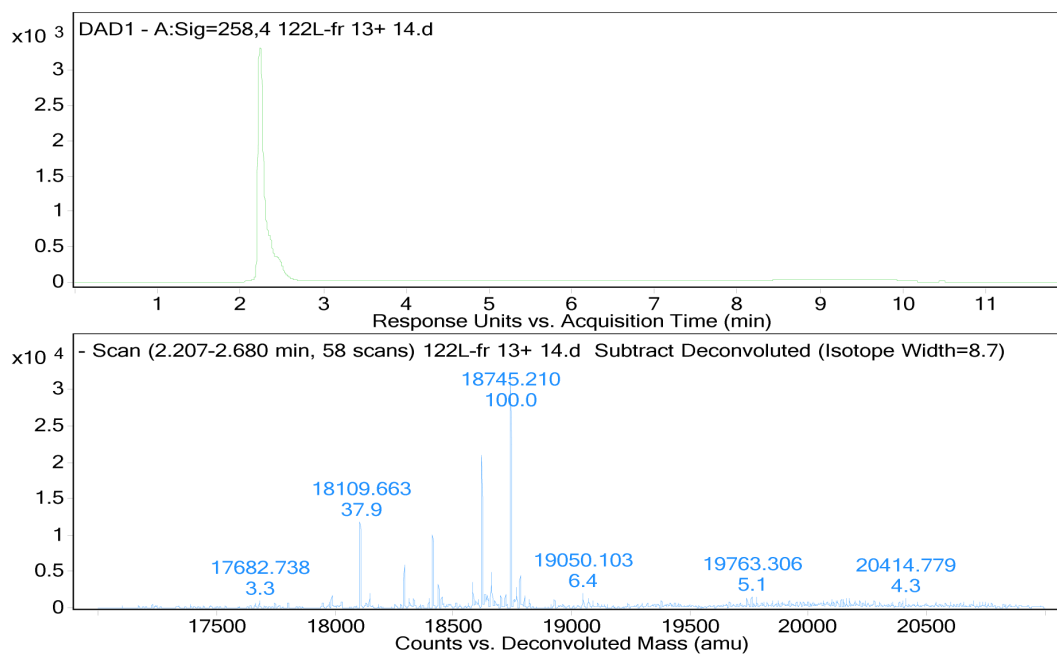


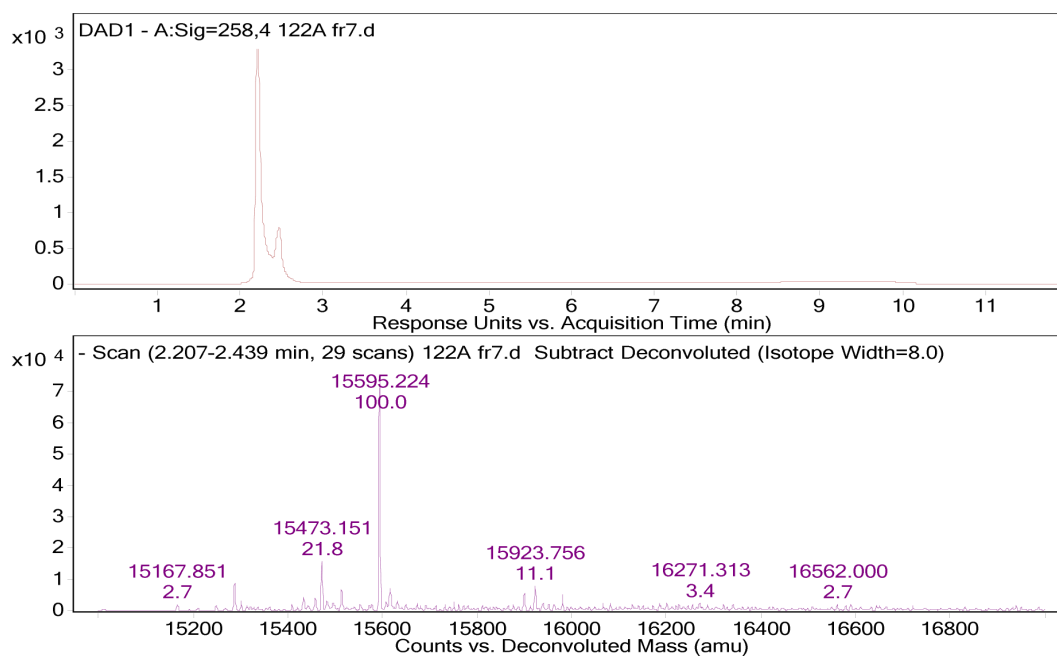
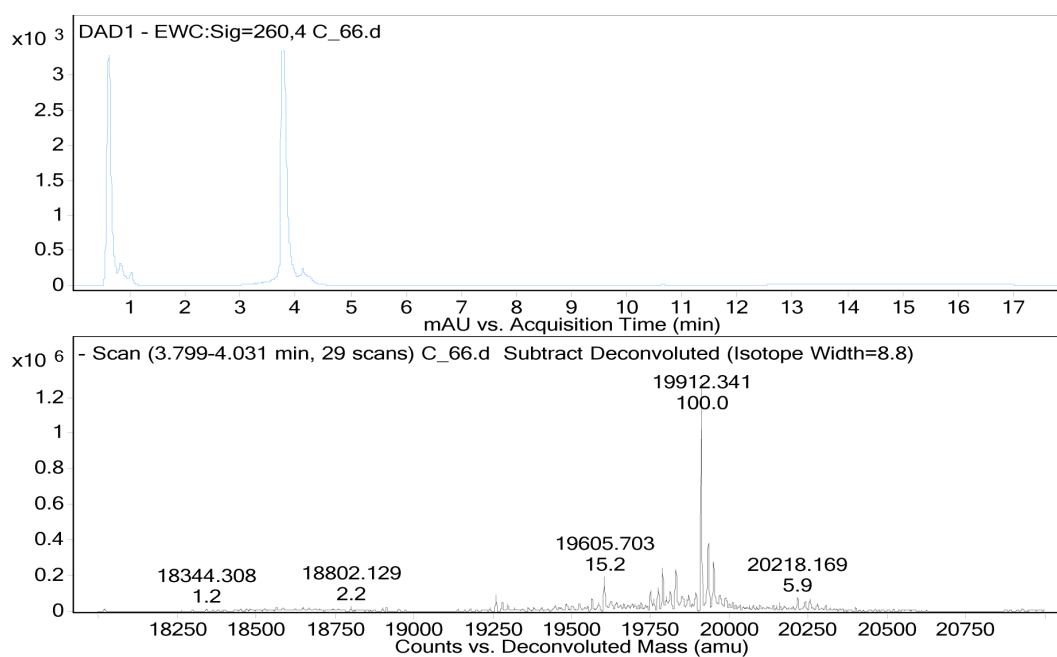
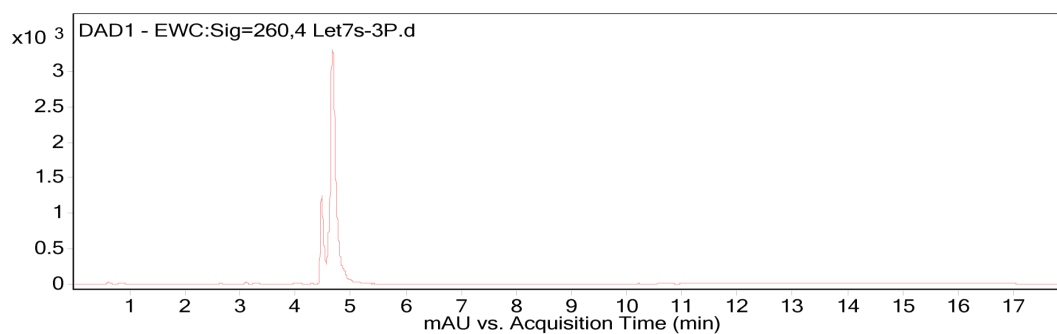


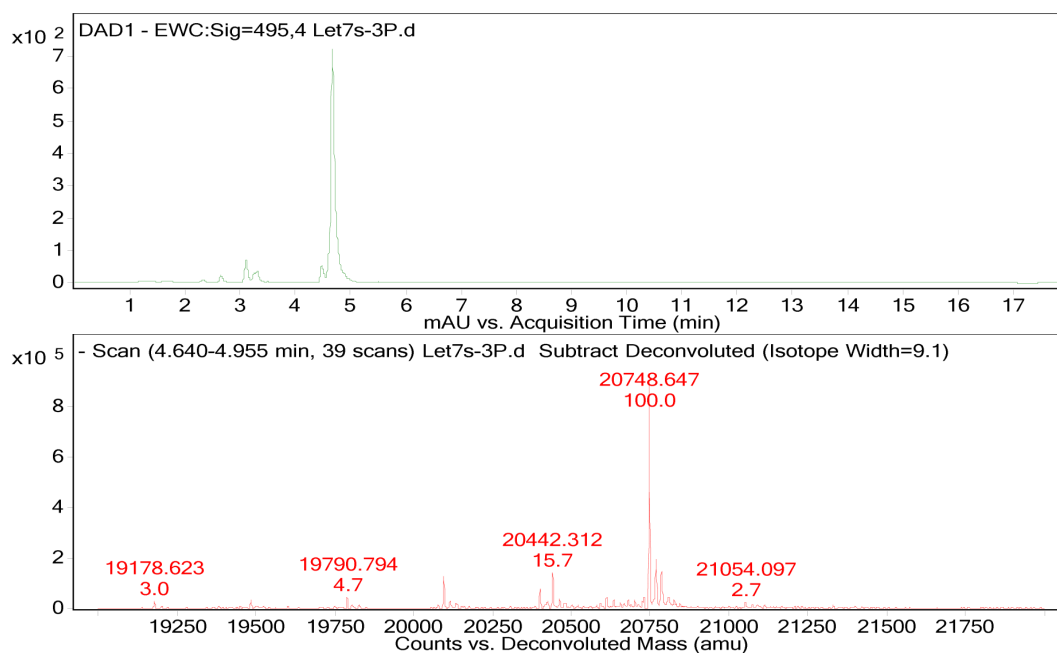
prä-miR-21 (Analyse der HPLC-Fraktion $t_R \sim 22$ min)



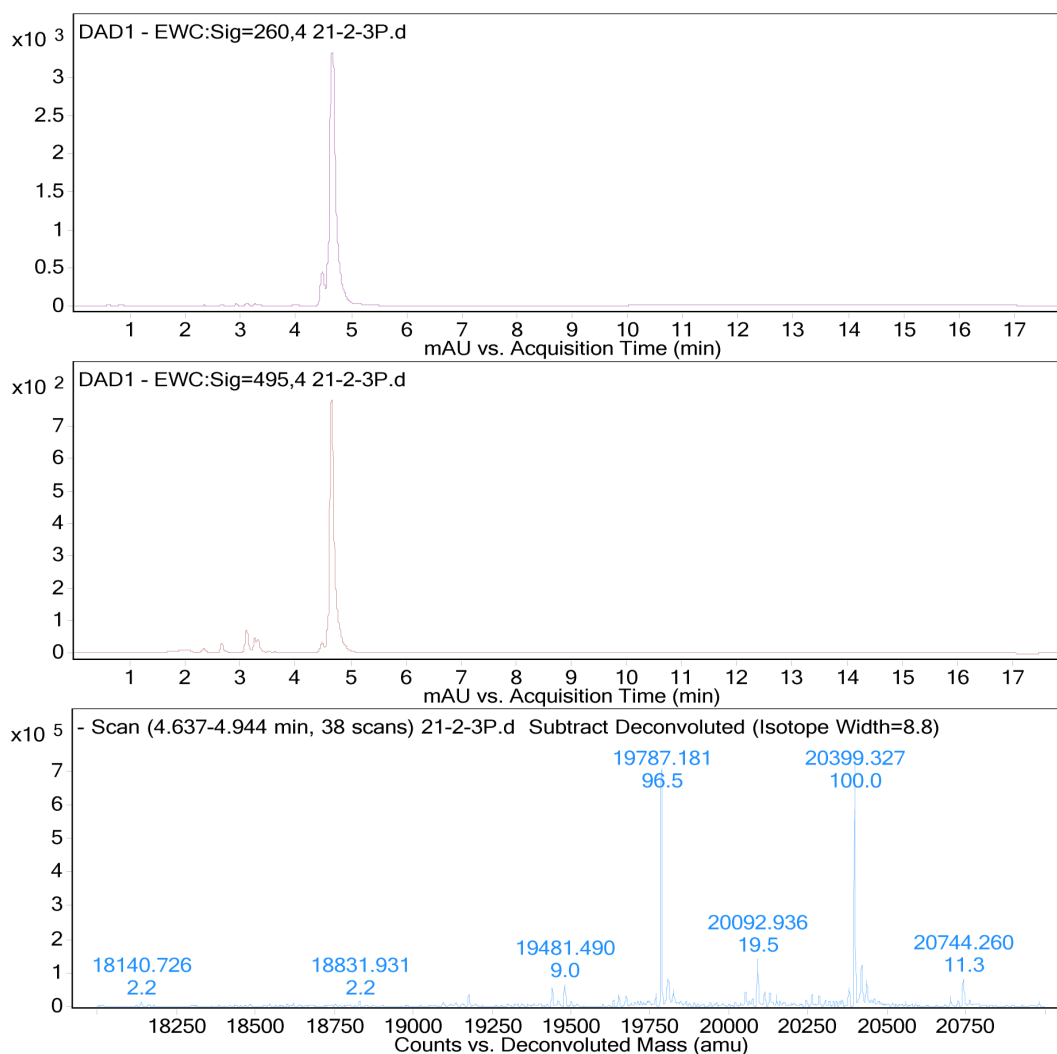
prä-miR-122 (Analyse der HPLC-Fraktion $t_R \sim 22$ min)

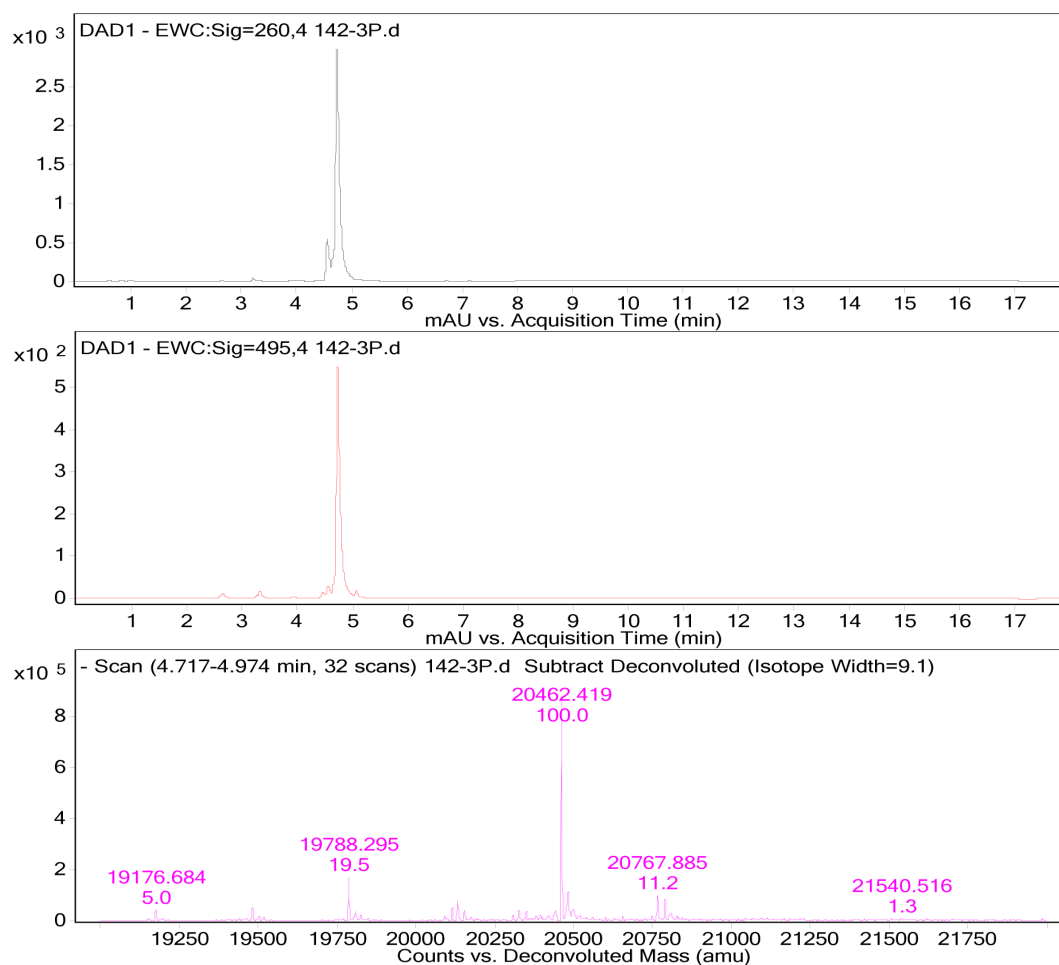


prä-miR-122-A (Analyse der HPLC-Fraktion $t_R \sim 22$ min)**prä-let7^U****DABprä-let7^{FAM}**

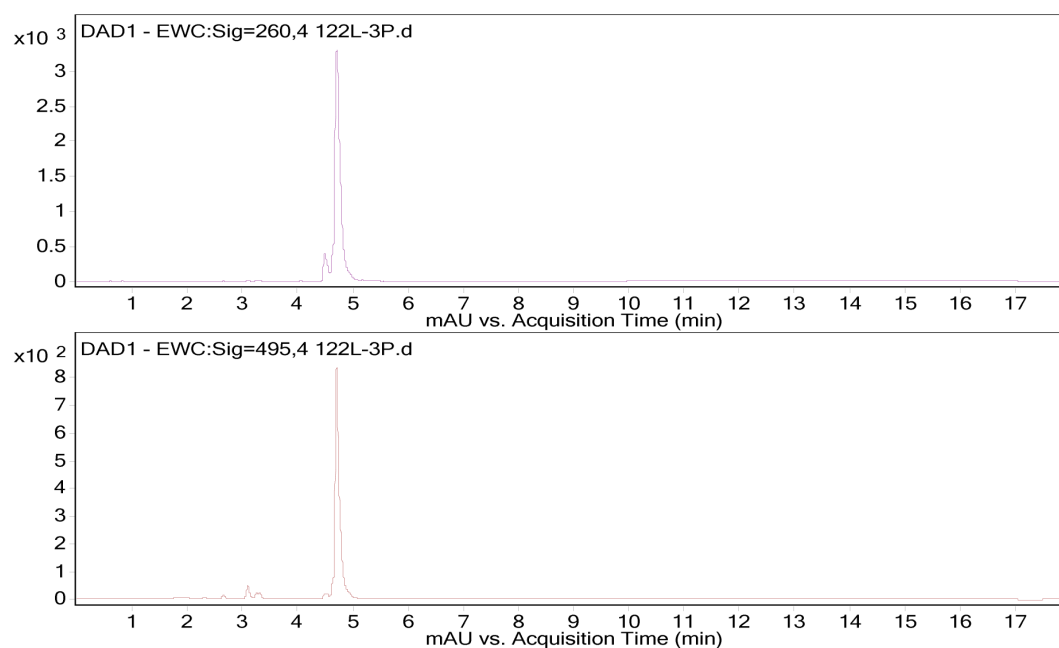


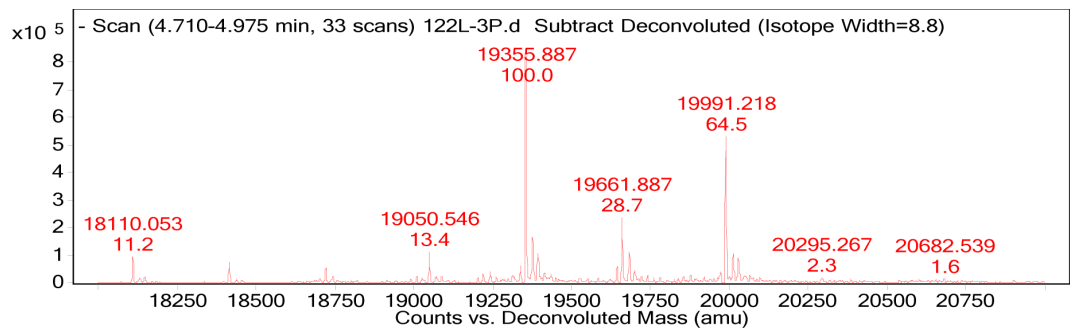
DABprä-miR-21^{FAM}



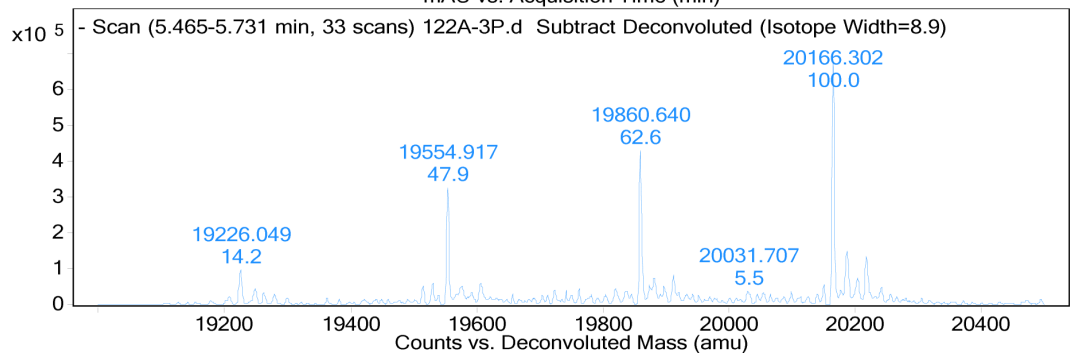
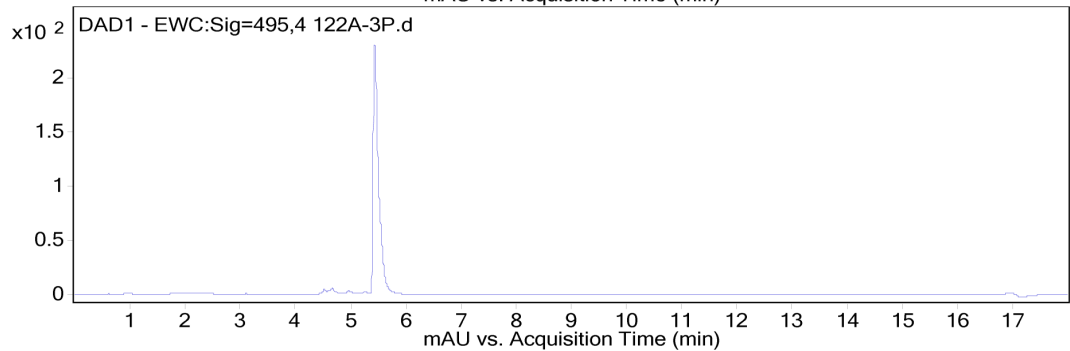
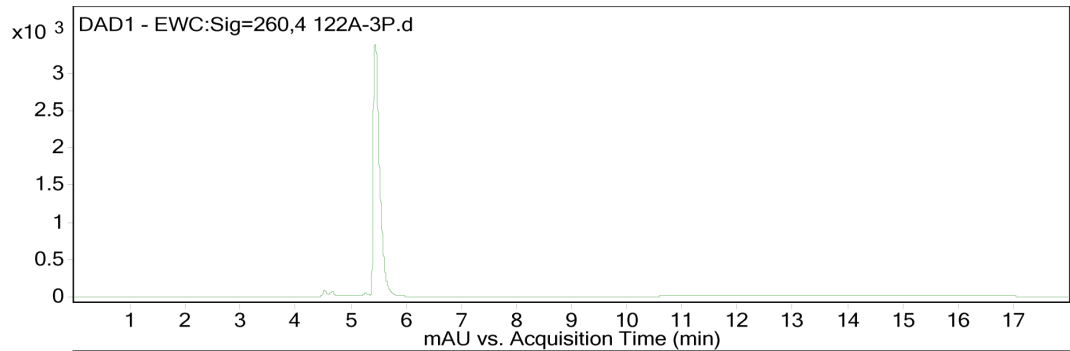
DABprä-miR-142^{FAM}

183

DABprä-miR-122^{FAM}



DABprä-miR-122^{ALX}



Literaturverzeichnis

- [1] J.-M. Claverie, *Science* **2001**, 291, 1255-1257.
- [2] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, V. Ambros, *Cell* **1993**, 75, 843-854.
- [3] a B. J. Reinhart, F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz, G. Ruvkun, *Nature* **2000**, 403, 901-906; b A. E. Pasquinelli, B. J. Reinhart, F. Slack, M. Q. Martindale, M. I. Kuroda, B. Maller, D. C. Hayward, E. E. Ball, B. Degnan, P. Muller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson, G. Ruvkun, *Nature* **2000**, 408, 86-89.
- [4] S. Griffiths-Jones, R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman, A. J. Enright, *Nucleic Acids Research* **2006**, 34, 140-144.
- [5] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, V. N. Kim, *The EMBO Journal* **2004**, 23, 4051-4060.
- [6] Y. Lee, C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim, V. N. Kim, *Nature* **2003**, 425, 415-419.
- [7] R. Yi, Y. Qin, I. G. Macara, B. R. Cullen, *Genes & Development* **2003**, 17, 3011-3016.
- [8] T. P. Chendrimada, R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura, R. Shiekhattar, *Nature* **2005**, 436, 740-744.
- [9] a H. Zhang, F. A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof, W. Filipowicz, *Cell* **2004**, 118, 57-68; b J.-E. Park, I. Heo, Y. Tian, D. K. Simanshu, H. Chang, D. Jee, D. J. Patel, V. N. Kim, *Nature* **2011**, 475, 201-205.
- [10] A. Khvorova, A. Reynolds, S. D. Jayasena, *Cell* **2003**, 115, 209-216.
- [11] a D. S. Schwarz, G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, P. D. Zamore, *Cell* **2003**, 115, 199-208; b Cameron L. Noland, E. Ma, Jennifer A. Doudna, *Molecular Cell* **2011**, 43, 110-121.
- [12] a G. Jagadeeswaran, Y. Zheng, N. Sumathipala, H. Jiang, E. L. Arrese, J. L. Soulages, W. Zhang, R. Sunkar, *BMC Genomics* **2010**, 11, 52; b L. Guo, Z. Lu, *PLoS ONE* **2010**, 5; cC. Matranga, Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel, P. D. Zamore, *Cell* **2005**, 123, 607-620.
- [13] a G. Hutvagner, M. J. Simard, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2008**, 9, 22-32; b V. N. Kim, J. Han, M. C. Siomi, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2009**, 10, 126-139.
- [14] J. Krol, I. Loedige, W. Filipowicz, *Nature Reviews Genetics* **2010**, 11, 597-610.
- [15] a D. Baek, J. Villén, C. Shin, F. D. Camargo, S. P. Gygi, D. P. Bartel, *Nature* **2008**, 455, 64-71; b M. Selbach, B. Schwanhausser, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin, N. Rajewsky, *Nature* **2008**, 455, 58-63; c H. Guo, N. T. Ingolia, J. S. Weissman, D. P. Bartel, *Nature* **2010**, 466, 835-840; d J. Liu, F. V. Rivas, J. Wohlschlegel, J. R. Yates, 3rd, R. Parker, G. J. Hannon, *Nature Cell Biology* **2005**, 7, 1261-1266.
- [16] a M. R. Friedlander, W. Chen, C. Adamidi, J. Maaskola, R. Einspanier, S. Knespel, N. Rajewsky, *Nature Biotechnology* **2008**, 26, 407-415; b A. Kozomara, S. Griffiths-Jones, *Nucleic Acids Research* **2011**, 39, D152-D157.
- [17] B. P. Lewis, C. B. Burge, D. P. Bartel, *Cell* **2005**, 120, 15-20.

- [18] I. Lee, S. S. Ajay, J. I. Yook, H. S. Kim, S. H. Hong, N. H. Kim, S. M. Dhanasekaran, A. M. Chinnaiyan, B. D. Athey, *Genome Research* **2009**, *19*, 1175-1183.
- [19] C. M. Croce, G. A. Calin, *Cell* **2005**, *122*, 6-7.
- [20] G. A. Calin, C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich, C. M. Croce, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, *99*, 15524-15529.
- [21] A. Cimmino, G. A. Calin, M. Fabbri, M. V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S. E. Wojcik, R. I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.-G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini, C. M. Croce, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2005**, *102*, 13944-13949.
- [22] G. A. Calin, C. Sevignani, C. D. Dumitru, T. Hyslop, E. Noch, S. Yendamuri, M. Shimizu, S. Rattan, F. Bullrich, M. Negrini, C. M. Croce, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2004**, *101*, 2999-3004.
- [23] G. A. Calin, C. M. Croce, *Nature Reviews Cancer* **2006**, *6*, 857-866.
- [24] J. Lu, G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz, T. R. Golub, *Nature* **2005**, *435*, 834-838.
- [25] M. S. Kumar, J. Lu, K. L. Mercer, T. R. Golub, T. Jacks, *Nature Genetics* **2007**, *39*, 673-677.
- [26] A. Esquela-Kerscher, F. J. Slack, *Nature Reviews Cancer* **2006**, *6*, 259-269.
- [27] S. Li, Z. Liang, L. Xu, F. Zou, *Molecular and Cellular Biochemistry* **2012**, *360*, 147-158.
- [28] P. Medina, M. Nolde, F. Slack, *Nature* **2010**, *467*, 86-90.
- [29] M. S. Kumar, S. J. Erkeland, R. E. Pester, C. Y. Chen, M. S. Ebert, P. A. Sharp, T. Jacks, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2008**, *105*, 3903-3908.
- [30] M. V. G. Latronico, D. Catalucci, G. Condorelli, *Circulation Research* **2007**, *101*, 1225-1236.
- [31] J. Krutzfeldt, M. Stoffel, *Cell Metabolism* **2006**, *4*, 9-12.
- [32] P. Provost, *Brain Research* **2010**, *18*, 58-66.
- [33] a C. L. Jopling, M. Yi, A. M. Lancaster, S. M. Lemon, P. Sarnow, *Science* **2005**, *309*, 1577-1581; b X. Tang, G. Tang, S. Özcan, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **2008**, *1779*, 697-701.
- [34] a X. Chen, Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, Y. Zhang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, J. Wang, K. Zen, J. Zhang, C.-Y. Zhang, *Cell Research* **2008**, *18*, 997-1006; b S. Li, Z. Liang, L. Xu, F. Zou, *Molecular and Cellular Biochemistry* **2012**, *360*, 147-158; c J. Zhang, H. Zhao, Y. Gao, W. Zhang, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2012**, *1826*, 32-43.
- [35] <http://www.clinicaltrials.gov/> ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01057199, NCT00862290, Zugriff 10.11.2012.
- [36] C. Arenz, *Angewandte Chemie International Edition* **2006**, *45*, 5048-5050.

- [37] a P. Trang, P. P. Medina, J. F. Wiggins, L. Ruffino, K. Kelnar, M. Omotola, R. Homer, D. Brown, A. G. Bader, J. B. Weidhaas, F. J. Slack, *Oncogene* **2010**, *29*, 1580-1587; b P. Trang, J. F. Wiggins, C. L. Daige, C. Cho, M. Omotola, D. Brown, J. B. Weidhaas, A. G. Bader, F. J. Slack, *Molecular Therapy* **2011**, *19*, 1116-1122; c A. G. Bader, D. Brown, M. Winkler, *Cancer Research* **2010**, *70*, 7027-7030; d F. Takeshita, L. Patrawala, M. Osaki, R. U. Takahashi, Y. Yamamoto, N. Kosaka, M. Kawamata, K. Kelnar, A. G. Bader, D. Brown, T. Ochiya, *Molecular Therapy* **2010**, *18*, 181-187.
- [38] a E. R. Rayburn, R. Zhang, *Drug Discovery Today* **2008**, *13*, 513-521; b A. K. Vaishnaw, J. Gollob, C. Gamba-Vitalo, R. Hutabarat, D. Sah, R. Meyers, T. de Fougerolles, J. Maraganore, *Silence* **2010**, *1*, 14.
- [39] A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **1998**, *391*, 806-811.
- [40] S. M. Elbashir, J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, T. Tuschl, *Nature* **2001**, *411*, 494-498.
- [41] A. Nykanen, B. Haley, P. D. Zamore, *Cell* **2001**, *107*, 309-321.
- [42] a J. C. Burnett, J. J. Rossi, K. Tiemann, *Biotechnology Journal* **2011**, *6*, 1130-1146; b John C. Burnett, John J. Rossi, *Chemistry & Biology* **2012**, *19*, 60-71.
- [43] a A. L. Jackson, S. R. Bartz, J. Schelter, S. V. Kobayashi, J. Burchard, M. Mao, B. Li, G. Cavet, P. S. Linsley, *Nature Biotechnology* **2003**, *21*, 635-637; b J. G. Doench, C. P. Petersen, P. A. Sharp, *Genes & Development* **2003**, *17*, 438-442.
- [44] H. Matzura, F. Eckstein, *European Journal of Biochemistry* **1968**, *3*, 448-452.
- [45] a S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, K.-i. Morio, Y. In, T. Ishida, T. Imanishi, *Tetrahedron Letters* **1997**, *38*, 8735-8738; b A. A. Koshkin, S. K. Singh, P. Nielsen, V. K. Rajwanshi, R. Kumar, M. Meldgaard, C. E. Olsen, J. Wengel, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 3607-3630; c C. F. Bennett, E. E. Swayze, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **2010**, *50*, 259-293.
- [46] P. Nielsen, M. Egholm, R. Berg, O. Buchardt, *Science* **1991**, *254*, 1497-1500.
- [47] D. A. Geselowitz, L. M. Neckers, *Antisense Research & Development* **1995**, *5*, 213-217.
- [48] J. Krutzfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, M. Stoffel, *Nature* **2005**, *438*, 685-689.
- [49] J. Elmen, M. Lindow, S. Schutz, M. Lawrence, A. Petri, S. Obad, M. Lindholm, M. Hedtjarn, H. F. Hansen, U. Berger, S. Gullans, P. Kearney, P. Sarnow, E. M. Straarup, S. Kauppinen, *Nature* **2008**, *452*, 896-899.
- [50] S. Obad, C. O. dos Santos, A. Petri, M. Heidenblad, O. Broom, C. Ruse, C. Fu, M. Lindow, J. Stenvang, E. M. Straarup, H. F. Hansen, T. Koch, D. Pappin, G. J. Hannon, S. Kauppinen, *Nature Genetics* **2011**, *43*, 371-378.
- [51] J. Xie, S. L. Ameres, R. Friedline, J.-H. Hung, Y. Zhang, Q. Xie, L. Zhong, Q. Su, R. He, M. Li, H. Li, X. Mu, H. Zhang, J. A. Broderick, J. K. Kim, Z. Weng, T. R. Flotte, P. D. Zamore, G. Gao, *Nature Methods* **2012**, *9*, 403-409.
- [52] R. E. Lanford, E. S. Hildebrandt-Eriksen, A. Petri, R. Persson, M. Lindow, M. E. Munk, S. Kauppinen, H. Orum, *Science* **2010**, *327*, 198-201.
- [53] <http://www.clinicaltrials.gov/> ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01200420, Zugriff 15.10.2012.

- [54] C. Avitabile, M. Saviano, L. D'Andrea, N. Bianchi, E. Fabbri, E. Brognara, R. Gambari, A. Romanelli, *Artificial DNA: PNA & XNA* **2012**, 3, 88-96.
- [55] M. S. Ebert, J. R. Neilson, P. A. Sharp, *Nature Methods* **2007**, 4, 721-726.
- [56] G. Shan, Y. Li, J. Zhang, W. Li, K. E. Szulwach, R. Duan, M. A. Faghihi, A. M. Khalil, L. Lu, Z. Paroo, A. W. S. Chan, Z. Shi, Q. Liu, C. Wahlestedt, C. He, P. Jin, *Nature Biotechnology* **2008**, 26, 933-940.
- [57] S. Melo, A. Villanueva, C. Moutinho, V. Davalos, R. Spizzo, C. Ivan, S. Rossi, F. Setien, O. Casanovas, L. Simo-Riudalbas, J. Carmona, J. Carrere, A. Vidal, A. Aytes, S. Puertas, S. Ropero, R. Kalluri, C. M. Croce, G. A. Calin, M. Esteller, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2011**, 108, 4394-4399.
- [58] Y.-L. Chiu, C. U. Dinesh, C.-y. Chu, A. Ali, K. M. Brown, H. Cao, T. M. Rana, *Chemistry & Biology* **2005**, 12, 643-648.
- [59] K. Watashi, M. L. Yeung, M. F. Starost, R. S. Hosmane, K.-T. Jeang, *Journal of Biological Chemistry* **2010**, 285, 24707-24716.
- [60] K. Gumireddy, D. D. Young, X. Xiong, J. B. Hogenesch, Q. Huang, A. Deiters, *Angewandte Chemie International Edition* **2008**, 47, 7482-7484.
- [61] D. D. Young, C. M. Connelly, C. Grohmann, A. Deiters, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, 132, 7976-7981.
- [62] D. Bose, G. Jayaraj, H. Suryawanshi, P. Agarwala, S. K. Pore, R. Banerjee, S. Maiti, *Angewandte Chemie International Edition* **2012**, 51, 1019-1023.
- [63] a C. M. Klemm, A. Berthelmann, S. Neubacher, C. Arenz, *European Journal of Organic Chemistry* **2009**, 2009, 2788-2794; b B. P. Davies, C. Arenz, *Angewandte Chemie* **2006**, 118, 5676-5679.
- [64] A. Rich, *Nature Structural & Molecular Biology* **2003**, 10, 247-249.
- [65] S. J. Schroeder, M. E. Burkard, D. H. Turner, *Biopolymers* **1999**, 52, 157-167.
- [66] T. Hermann, D. J. Patel, *Structure* **2000**, 8, R47-54.
- [67] L. Jiang, D. J. Patel, *Nature Structural Biology* **1998**, 5, 769-774.
- [68] aM. A. Newman, J. M. Thomson, S. M. Hammond, *RNA* **2008**, 14, 1539-1549; bF. Mayr, A. Schutz, N. Doge, U. Heinemann, *Nucleic Acids Research* **2012**, 40, 7492-7506.
- [69] M. Trabucchi, P. Briata, M. Garcia-Mayoral, A. D. Haase, W. Filipowicz, A. Ramos, R. Gherzi, M. G. Rosenfeld, *Nature* **2009**, 459, 1010-1014.
- [70] M. Krishnamurthy, K. Simon, A. M. Orendt, P. A. Beal, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, 46, 7044-7047.
- [71] S. Chirayil, R. Chirayil, K. J. Luebke, *Nucleic Acids Research* **2009**, 37, 5486-5497.
- [72] M. Maiti, K. Nauwelaerts, P. Herdewijn, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2012**, 22, 1709-1711.
- [73] a M.-P. Mingeot-Leclercq, P. M. Tulkens, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, 43, 1003-1012; b D. E. Bates, *Drugs Today* **2003**, 39, 277-285; cM.-P. Mingeot-Leclercq, Y. Glupczynski, P. M. Tulkens, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1999**, 43, 727-737.

- [74] a T. Hermann, *Biochimie* **2006**, *88*, 1021-1026; b B. François, R. J. M. Russell, J. B. Murray, F. Aboul-ela, B. Masquida, Q. Vicens, E. Westhof, *Nucleic Acids Research* **2005**, *33*, 5677-5690.
- [75] M. B. Feldman, D. S. Terry, R. B. Altman, S. C. Blanchard, *Nature Chemical Biology* **2010**, *6*, 54-62.
- [76] L. Szilagyi, Z. S. Pusztahelyi, S. Jakab, I. Kovacs, *Carbohydrate Research* **1993**, *247*, 99-109.
- [77] a D. A. Mann, I. Mikaélian, R. W. Zimmel, S. M. Green, A. D. Lowe, T. Kimura, M. Singh, P. Jonathan, G. Butler, M. J. Gait, J. Karn, *Journal of Molecular Biology* **1994**, *241*, 193-207; b D. E. Wemmer, *Chemistry & Biology* **1996**, *3*, 17-19.
- [78] a H.-Y. Mei, M. Cui, A. Heldsinger, S. M. Lemrow, J. A. Loo, K. A. Sannes-Lowery, L. Sharmeen, A. W. Czarnik, *Biochemistry* **1998**, *37*, 14204-14212; b S. Wang, P. W. Huber, M. Cui, A. W. Czarnik, H.-Y. Mei, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5549-5557.
- [79] K. A. Lacourciere, J. T. Stivers, J. P. Marino, *Biochemistry* **2000**, *39*, 5630-5641.
- [80] H. Wang, Y. Tor, *Angewandte Chemie* **1998**, *110*, 117-120.
- [81] a B. François, R. J. M. Russell, J. B. Murray, F. Aboul-ela, B. Masquida, Q. Vicens, E. Westhof, *Nucleic Acids Research*, *33*, 5677-5690; b F. Zhao, Q. Zhao, K. F. Blount, Q. Han, Y. Tor, T. Hermann, *Angewandte Chemie* **2005**, *117*, 5463-5468.
- [82] a K. Moehle, Z. Athanassiou, K. Patora, A. Davidson, G. Varani, J. A. Robinson, *Angewandte Chemie International Edition* **2007**, *46*, 9101-9104; b D. Raghunathan, V. M. Sánchez-Pedregal, J. Junker, C. Schwiegk, M. Kalesse, A. Kirschning, T. Carlomagno, *Nucleic Acids Research* **2006**, *34*, 3599-3608.
- [83] S. Yoshizawa, D. Fourmy, R. G. Eason, J. D. Puglisi, *Biochemistry* **2002**, *41*, 6263-6270.
- [84] M. D. Disney, L. P. Labuda, D. J. Paul, S. G. Poplawski, A. Pushechnikov, T. Tran, S. P. Velagapudi, M. Wu, J. L. Childs-Disney, *Journal of the American Chemical Society* **2008**, *130*, 11185-11194.
- [85] D. J. Paul, S. J. Seedhouse, M. D. Disney, *Nucleic Acids Research* **2009**, *37*, 5894-5907.
- [86] M. Chittapragada, S. Roberts, Y. W. Ham, *Perspect Medicinal Chemistry* **2009**, *3*, 21-37.
- [87] a W. A. Greenberg, E. S. Priestley, P. S. Sears, P. B. Alper, C. Rosenbohm, M. Hendrix, S.-C. Hung, C.-H. Wong, *Journal of the American Chemical Society* **1999**, *121*, 6527-6541; b T. Yamasaki, Y. Narita, H. Hoshi, S. Aburaki, H. Kamei, T. Naito, H. Kawaguchi, *The Journal of Antibiotics* **1991**, *44*, 646-658.
- [88] Y. Ding, S. A. Hofstadler, E. E. Swayze, R. H. Griffey, *Organic Letters* **2001**, *3*, 1621-1623.
- [89] a A. Venot, E. E. Swayze, R. H. Griffey, G. J. Boons, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1228-1236; b S. Barluenga, K. B. Simonsen, E. S. Littlefield, B. K. Ayida, D. Vourloumis, G. C. Winters, M. Takahashi, S. Shandrick, Q. Zhao, Q. Han, T. Hermann, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14*, 713-718; c Y. Zhou, V. E. Gregor, B. K. Ayida, G. C. Winters, Z. Sun, D. Murphy, G. Haley, D. Bailey, J. M. Froelich, S. Fish, S. E. Webber, T. Hermann, D. Wall, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*,

1206-1210; d D. Vourloumis, G. C. Winters, M. Takahashi, K. B. Simonsen, B. K. Ayida, S. Shandrick, Q. Zhao, T. Hermann, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 879-885.

- [90] a N. W. Luedtke, Q. Liu, Y. Tor, *Biochemistry* **2003**, *42*, 11391-11403; b H. Xi, D. P. Arya, *Current Medicinal Chemistry – Anti-Cancer Agents* **2005**, *5*, 327-338; c J. B. H. Tok, J. Cho, R. R. Rando, *Tetrahedron* **1999**, *55*, 5741-5758.
- [91] S. J. Sucheck, A. L. Wong, K. M. Koeller, D. D. Boehr, K. Draker, P. Sears, G. D. Wright, C.-H. Wong, *Journal of the American Chemical Society* **2000**, *122*, 5230-5231.
- [92] D. H. Ryu, A. Litovchick, R. R. Rando, *Biochemistry* **2002**, *41*, 10499-10509.
- [93] S. Jana, J. K. Deb, *Applied Microbiology and Biotechnology* **2006**, *70*, 140-150.
- [94] a P. Shaul, K. D. Green, R. Rutenberg, M. Kramer, Y. Berkov-Zrihen, E. Breiner-Goldstein, S. Garneau-Tsodikova, M. Fridman, *Organic & Biomolecular Chemistry* **2011**, *9*, 4057-4063; b C.-H. Liang, A. Romero, D. Rabuka, P. W. M. Sgarbi, K. A. Marby, J. Duffield, S. Yao, M. L. Cheng, Y. Ichikawa, P. Sears, C. Hu, S.-B. Hwang, Y.-K. Shue, S. J. Sucheck, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 2123-2128.
- [95] a M. I. Almeida, R. M. Reis, G. A. Calin, *Mutation Research – Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2011**, *717*, 1-8; b H. Wang, Y. Tor, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **1997**, *7*, 1951-1956.
- [96] K. Michael, H. Wang, Y. Tor, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1999**, *7*, 1361-1371.
- [97] B. Wu, J. Yang, D. Robinson, S. Hofstadler, R. Griffey, E. E. Swayze, Y. He, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 3915-3918.
- [98] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2004-2021.
- [99] V. Jäger, *Angewandte Chemie* **1985**, *97*, 718-719.
- [100] a V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie International Edition* **2002**, *41*, 2596-2599; b C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *The Journal of Organic Chemistry* **2002**, *67*, 3057-3064.
- [101] a T. R. Chan, R. Hilgraf, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Organic Letters* **2004**, *6*, 2853-2855; b D. Soriano del Amo, W. Wang, H. Jiang, C. Besanceney, A. C. Yan, M. Levy, Y. Liu, F. L. Marlow, P. Wu, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 16893-16899.
- [102] P. S. Donnelly, S. D. Zanatta, S. C. Zammit, J. M. White, S. J. Williams, *Chemical Communications* **2008**, 2459-2461.
- [103] S. I. Presolski, V. Hong, S.-H. Cho, M. G. Finn, *Journal of the American Chemical Society* **2010**, *132*, 14570-14576.
- [104] J. R. Thomas, X. Liu, P. J. Hergenrother, *Journal of the American Chemical Society* **2005**, *127*, 12434-12435.
- [105] C. M. Klemm, Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, **2007**.
- [106] M. M. Lee, J. L. Childs-Disney, A. Pushechnikov, J. M. French, K. Sobczak, C. A. Thornton, M. D. Disney, *Journal of the American Chemical Society* **2009**, *131*, 17464-17472.
- [107] M. D. Disney, J. L. Childs-Disney, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 649-656.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Claudine Mercedes Dojahn, die vorliegende Dissertation selbstständig erarbeitet und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur verfasst zu haben.

Ort | Datum

Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Christoph Arenz für die interessante und fachübergreifende Themenstellung, für die fortwährende Unterstützung in der Dissertation sowie die stete Bereitschaft zu konstruktiven Diskussionen.

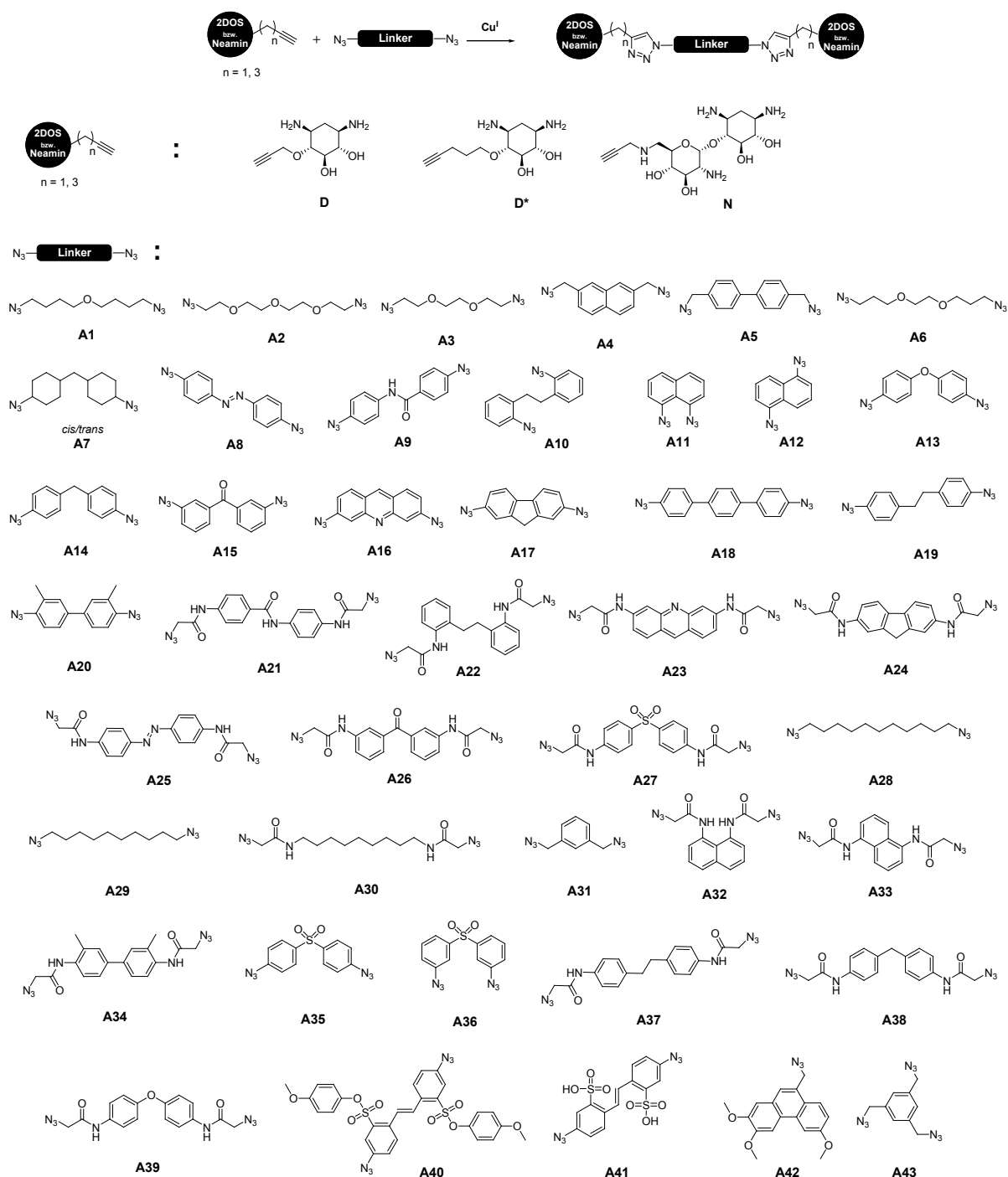
Für die ideelle und finanzielle Unterstützung danke ich der Studienstiftung des deutschen Volkes.

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Mitarbeitern der analytischen Serviceabteilung des Instituts für Chemie bedanken. Insbesondere danke ich Frau Angela Thiesies und Frau Katharina Pfaff aus der NMR-Abteilung für die Aufnahme einer unüberschaubaren Anzahl von NMR-Spektren – keine Akkumulation, kein Sonderwunsch war ihnen zu viel. Auch Frau Angelika Woyda aus der MS-Abteilung hat einen wertvollen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet. In diesem Zusammenhang danke ich auch herzlich Dr. Joachim Leistner sowie Dipl.-Chem. Jan Falkenhagen für die Unterstützung bei der Charakterisierung der Substanzbibliothek-Mitglieder. Besonders danke ich auch Dipl.-Chem. Marlen Hesse für die Einweisung in das *RNase*-freie-Arbeiten und die tatkräftige Unterstützung beim Screening. Letzteren beiden sowie Felix Hövelmann und Alexander Roloff danke ich zudem für die Durchsicht des Manuskripts. Des Weiteren bedanke ich mich auch bei allen meinen Forschungspraktikanten für ihr Engagement sowie bei Dr. Brian Davies für die wertvollen Anregungen auf dem RNA-Gebiet. Dank zolle ich schließlich auch allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Arenz und Seitz, insbesondere meinen Laborkollegen Adrian Glas, Thomas Pinkert und Patrick Wilke, die stets für ein gutes Arbeitsklima sorgten.

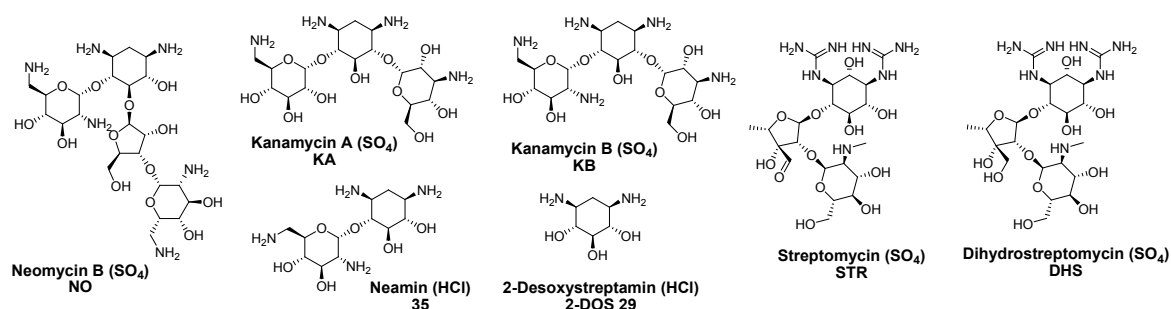
Meine Familie hat meine Interessen stets gefördert und mich ununterbrochen und liebevoll unterstützt, dafür gebührt ihnen großer Dank.

Schließlich bin ich auch meinem Mann Oliver für so unendliches vieles dankbar, besonders aber für seine stete Zuversicht und den emotionalen Rückhalt. Zusammen haben wir den Würfel von allen Seiten betrachtet – und der ist rund.

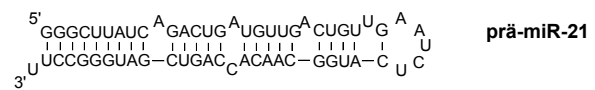
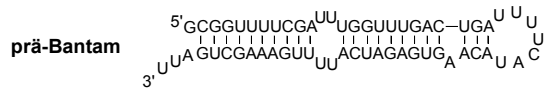
Übersicht der verwendeten Grundbausteine zum Aufbau der Substanzbibliothek durch CuAAC



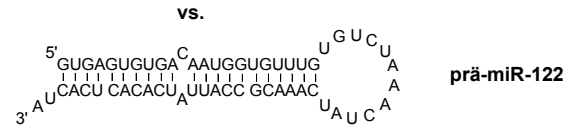
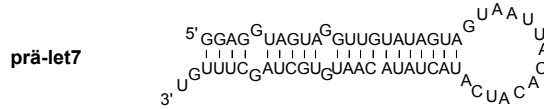
Unmodifizierte Aminoglykoside, die im Reifungsassay getestet wurden



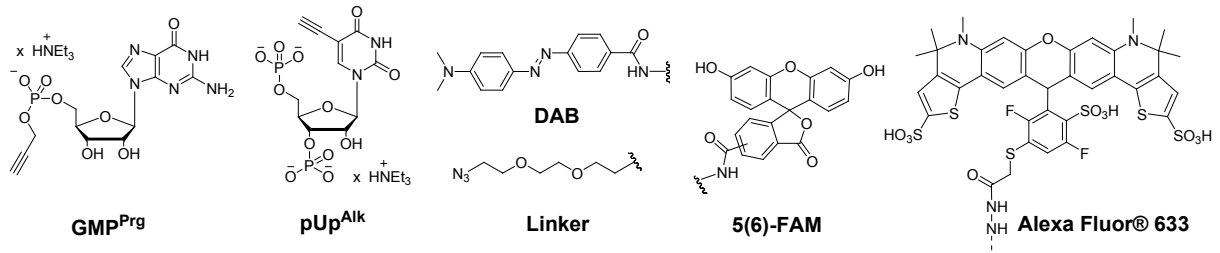
Sekundärstrukturen von Ziel-prä-miRNAs für das Screening der Substanzbibliothek



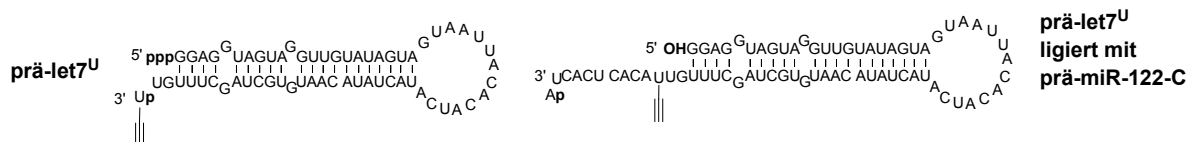
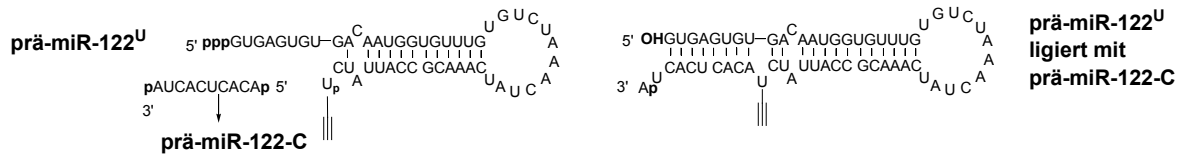
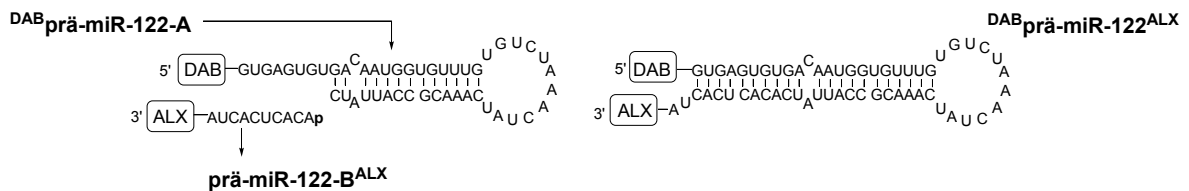
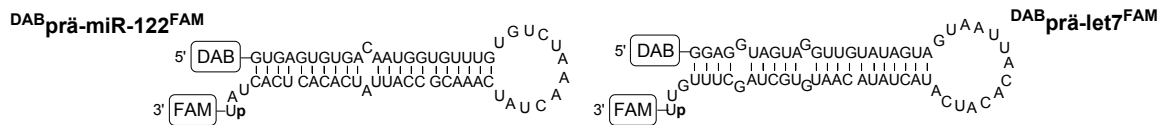
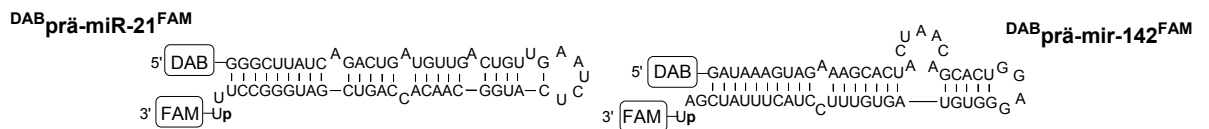
vs.



Verbindungen für eine CuAAC-basierte Funktionalisierungsstrategie von prä-miRNAs



Sekundärstrukturen modifizierter prä-miRNAs



Hinweise zur RNA-Kurznotation

Kennzeichnung vorangestellt = 5'-Ende

DAB = mit DAB konjugiert

ALX = mit ALX konjugiert

ppp = Triphosphat

Kennzeichnung nachgestellt = 3'-Ende

FAM = mit 5(6)-FAM konjugiert

U = C5-Ethynyl-Uridin

p = Monophosphat